

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS DE PACIENTES  
ALÉRGICOS A MARISCO Y SU CORRELACIÓN CON LOS HALLAZGOS IN  
VITRO. MAPA EPITÓPICO DE CUATRO ALERGENOS DE GAMBA.**

**Silvia Sánchez García**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Joaquín Sastre**

**Dra. M. Dolores Ibáñez Sandín**



**A mi padre, modelo e inspiración del esfuerzo y trabajo diarios**

**A mi madre, ejemplo de coraje y superación**

**A mi bisabuela, luchadora de oficio**





“Nada es imposible para una mente dispuesta”

(Proverbio japonés)



# INDICE



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>ANGLICISMOS .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
1. Alergia a alimentos: su importancia y repercusión en la calidad de vida.....	27
2. La reacción alérgica inmediata.....	31
3. Mecanismo inmunológico de la alergia a alimentos .....	33
3.1. Papel de la mucosa intestinal.....	33
3.2. Diferenciación hacia fenotipos Th1 y Th2 .....	34
3.3. Células T reguladoras .....	36
4. Alérgenos .....	38
4.1. Definición .....	38
4.2. Características .....	38
4.3. Nomenclatura y clasificación .....	39
5. Alergia a mariscos: su relevancia .....	41
6. Características específicas de la alergia a gamba .....	45
6.1. Tropomiosina .....	46
6.2. Arginin-kinasa .....	48
6.3. Cadena ligera de la miosina .....	50
6.4. Proteína ligadora del calcio sarcoplásmico .....	50
6.5. Otros alérgenos descritos .....	51
7. Reactividad cruzada .....	52
7.1. Reactividad cruzada con ácaros: síndrome ácaros-mariscos.....	53
7.2. Reactividad cruzada con otros invertebrados .....	56
8. Métodos diagnósticos en alergia a marisco .....	57
9. La tecnología del microarray o micromatriz .....	59
10. Medidas terapéuticas en alergia a marisco .....	61
11. Futuro de la alergia a alimentos .....	62
<b>OBJETIVO DEL ESTUDIO .....</b>	<b>65</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
1. Diseño del estudio .....	71
2. Selección de los pacientes .....	72
2.1. Pacientes con historia de reacción alérgica a gamba .....	72
2.1.1. Criterios de inclusión .....	72
2.1.2. Criterios de exclusión .....	72
2.2. Pacientes alérgicos a ácaros sin historia de reacción alérgica a gamba .....	73
2.2.1. Criterios de inclusión .....	73
2.2.2. Criterios de exclusión .....	73
3. Características de la población .....	74
4. Estudio in vivo .....	76

4.1. Prueba cutánea con la técnica prick-prick.....	76
4.2. Pruebas cutáneas con extractos comerciales .....	76
4.3. Provocación oral, doble ciego con gamba (PODCCP).....	76
4.4. Asignación de grupos para el análisis de los resultados .....	78
4.5. Análisis de los datos clínicos .....	78
5. Estudio in vitro .....	80
5.1. Determinación de IgE específica .....	80
5.2. Preparación de extractos .....	80
5.3. Electroforesis unidimensional e inmunotransferencia con gamba cruda y cocida .....	81
5.4. Electroforesis unidimensional e inmunotransferencia con <i>D.pteronyssinus</i> , nPen m 1 y rDer p 10 .....	82
5.5. Análisis peptídico mediante micromatriz .....	82
5.5.1. Síntesis peptídica y sus condiciones de impresión .....	83
5.5.2. Etiquetado .....	84
5.5.3. Análisis de los datos .....	87
<b>RESULTADOS</b> .....	89
1. Pacientes incluidos .....	91
2. Características de la población .....	92
2.1. Características demográficas de la población .....	92
2.1.1. Pacientes que refieren síntomas con gamba .....	92
2.1.2. Pacientes alérgicos a ácaros .....	92
2.2. Características clínicas de los pacientes con síntomas con gamba .....	93
2.2.1. Exposición a gamba y clínica alérgica .....	93
2.2.2. Síntomas por exposición a ácaros en los pacientes con síntomas con gamba .....	97
2.2.3. Morbilidad asociada .....	98
2.3. Características clínicas del grupo de pacientes alérgicos a ácaros .....	99
3. Estudio in vivo .....	100
3.1. Prueba cutánea a gamba y otros mariscos.....	100
3.2. Prueba cutánea a otros invertebrados .....	100
3.3. Provocación oral, doble ciego, con gamba .....	101
4. Estudio in vitro .....	101
4.1. Determinación de IgE total y específica a gamba y tropomiosina .....	101
4.2. Determinación de IgE específica a otros invertebrados .....	102
4.3. Determinación de IgE específica a otros mariscos .....	102
5. Clasificación por grupos .....	103
6. Comparación de los pacientes según la expresividad clínica por exposición a gamba (grupos A y B) y características descriptivas del grupo C .....	104
6.1. Perfil del paciente .....	104
6.1.1. Características demográficas .....	104

6.1.2.	Características de los síntomas tras exposición a gamba	106
6.1.3.	Características de los síntomas tras exposición a ácaros en pacientes con síntomas con gamba .....	109
6.1.4.	Morbilidad asociada .....	109
6.2.	Comparación de resultados de las pruebas cutáneas .....	112
6.2.1.	Prueba cutánea a gamba .....	113
6.2.2.	Prueba cutánea a otros invertebrados .....	113
6.2.3.	Prueba en prick-prick frente a otros mariscos .....	113
6.3.	Comparación de resultados de IgE .....	115
6.3.1.	IgE total .....	115
6.3.2.	IgE específica a gamba .....	115
6.3.3.	IgE específica a tropomiosina .....	115
6.3.4.	IgE específica a otros invertebrados .....	116
6.3.5.	IgE específica a otros mariscos .....	119
6.3.6.	Curvas ROC .....	122
7.	Comparación de los pacientes según la edad (Grupos P y M) .....	125
7.1.	Perfil del paciente .....	126
7.1.1.	Características demográficas .....	126
7.1.2.	Características de los síntomas tras exposición a gamba	127
7.2.	Comparación de resultados de las pruebas cutáneas .....	129
7.2.1.	Prueba cutánea a gamba .....	129
7.2.2.	Prueba cutánea a otros invertebrados .....	129
7.2.3.	Prueba en prick-prick frente a otros mariscos .....	131
7.3.	Comparación de resultados de IgE entre los grupos de pacientes P y M .....	133
7.3.1.	IgE específica a gamba .....	133
7.3.2.	IgE específica a tropomiosina .....	134
7.3.3.	IgE específica a otros invertebrados .....	134
7.3.4.	IgE específica a otros mariscos .....	137
8.	Electroforesis e inmunotransferencia .....	138
8.1.	Electroforesis unidimensional e inmunotransferencia con gamba cruda y cocida .....	138
8.2.	Electroforesis e inmunotransferencia con D. pteronyssinus, nPen m 1 y rDer p 10 .....	141
9.	Micromatriz .....	144
9.1.	Identificación epitópica de los alérgenos de gamba: Tropomiosina (Lit v 1), Arginin-Kinasa (Lit v 2), Cadena Ligera de la Miosina (Lit v 3) y Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico (Lit v 4).....	144
9.2.	Estudios de inhibición .....	149
9.3.	Relación del mapa epitópico según la expresividad clínica: comparación entre los grupos A (provocación positiva) y B (provocación negativa) .....	151
9.4.	Relación del mapa epitópico según la edad: comparación entre población pediátrica y población adulta .....	156

<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>159</b>
1. Características demográficas de la población estudiada con síntomas de alergia a gamba .....	163
2. Características clínicas de la población estudiada con síntomas de alergia a gamba .....	166
2.1. La vía de exposición .....	166
2.2. Forma de preparación .....	167
2.3. Síntomas percibidos .....	168
2.4. Tiempo de latencia .....	168
2.5. Morbilidad asociada .....	169
3. Comparación de datos clínicos, demográficos e inmunológicos según la expresividad clínica .....	169
4. Comparación de datos clínicos, demográficos e inmunológicos según la edad .....	177
5. Caracterización inmunológica de los alérgenos reconocidos por la población .....	179
5.1. Gamba cruda y cocida .....	179
5.2. Electroforesis unidimensional e inmunoblotting con D. pteronyssinus, nPen m1 y rDer p10 .....	180
6. Mapa epitópico de los cuatro alérgenos principales .....	182
6.1. Comparación epitópica según expresividad clínica .....	184
6.2. Comparación epitópica según edad .....	187
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>197</b>

## **FIGURAS**

Figura 1. Etapas de la reacción alérgica a alimentos .....	31
Figura 2. Esquema de la respuesta inmune y liberación de citocinas .....	35
Figura 3. Clasificación taxonómica de los mariscos .....	42
Figura 4. Proteínas alergénicas de gamba .....	46
Figura 5. Cuestionario demográfico y descriptivo .....	75
Figura 6. Preparación de las placas de microarray .....	85
Figura 7. Señal fluorescente de microarray digitalizada .....	86
Figura 8. Diagrama de flujo del proyecto .....	91
Figura 9. Características clínicas de la exposición a gamba .....	94
Figura 10. Relación entre los síntomas percibidos tras exposición a gamba y el tiempo de latencia de su aparición tras el contacto con gamba ....	97
Figura 11. Relación entre la edad y la expresividad clínica .....	105
Figura 12. Distribución del lugar de origen de la población estudiada y su correlación con la expresividad clínica .....	106
Figura 13. Relación de los síntomas percibidos y la expresividad clínica.....	107
Figura 14. Relación del tiempo de latencia y la expresividad clínica .....	108
Figura 15. Porcentaje de pacientes alérgicos a ácaros, según su	



expresividad clínica con gamba.....	109
Figura 16. Relación entre morbilidad alérgica asociada y expresividad clínica .....	111
Figura 17. Resultado de las pruebas cutáneas positivas en función de la expresividad clínica .....	114
Figura 18. Relación de los valores de IgE específica a invertebrados y expresividad clínica .....	118
Figura 19. Comparación de los valores de IgE específica a gamba, tropomiosina y otros mariscos según expresividad clínica .....	121
Figura 20. Curvas ROC para los alérgenos cuya IgE específica muestran una capacidad superior a 0,9 para discriminar pacientes alérgicos a gamba .....	122
Figura 21. Curvas ROC para los alérgenos cuya IgE específica muestran una capacidad superior a 0,8 para discriminar pacientes alérgicos a gamba .....	123
Figura 22. Curvas ROC para los niveles de IgE específica a invertebrados con capacidad pobre para discriminar pacientes alérgicos a gamba.....	124
Figura 23. Relación entre los síntomas percibidos según el rango de edad en pacientes con PODCCP positiva.....	128
Figura 24. Relación entre el tiempo de latencia de aparición de los síntomas y la edad de los pacientes .....	129
Figura 25. Pruebas cutáneas a invertebrados de los pacientes con reactividad clínica a gamba, en función de la edad .....	130
Figura 26. Comparación del resultado de las pruebas cutáneas positivas a mariscos del grupo A, en función de la edad del paciente.....	132
Figura 27. Resultados de los valores de IgE específica a gamba según la edad..	133
Figura 28. Resultados de los valores de IgE específica a tropomiosina según la edad .....	134
Figura 29. Comparación de IgE específica a invertebrados entre pacientes alérgicos a gamba, en función de la edad .....	135
Figura 30. Comparación de los valores de IgE específica a mariscos entre pacientes alérgicos a gamba, en función de la edad.....	137
Figura 31. Inmunoblotting con extracto completo de gamba cruda y cocida.....	139
Figura 32. Electroforesis unidimensional -SDS-Page con extracto completo de D.pteronyssinus .....	141
Figura 33. Inmunoblotting con extracto completo de D. pteronyssinus, nPen m1 y recombinante rDer p10.....	142
Figura 34. Diferencias en la fijación de IgE del suero de pacientes de cada grupo a cada una de las bandas proteicas y extracto completo de gamba y D.pteronyssinus .....	143
Figura 35. Análisis por Tile-map e identificación de epítomos fijadores de IgE en tropomiosina, Cadena Ligera de la miosina, Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico y Arginin-Kinasa.....	146
Figura 36. Secuencia de aminoácidos y epítomos de cada una de las cuatro proteínas alergénicas .....	148

Figura 37. Inhibición de péptidos de tropomiosina .....	150
Figura 38. Análisis por Tile-map de los péptidos identificados .....	153
Figura 39. Comparación de reconocimiento epitópico de gamba entre niños y adultos.....	158

## **TABLAS**

Tabla I. Consumo de marisco en España durante el primer semestre de 2013..	44
Tabla II. Tiempo de latencia desde la exposición a gamba hasta el inicio de los síntomas .....	96
Tabla III. Morbilidad alérgica asociada a los pacientes que acudían con síntomas tras exposición a gamba .....	99
Tabla IV. Valores de IgE específica a invertebrados .....	102
Tabla V. Valores de IgE específica a mariscos .....	103
Tabla VI. Pruebas cutáneas según expresividad clínica .....	112
Tabla VII. Valores de IgE específica a gamba y tropomiosina según expresividad clínica .....	116
Tabla VIII. Valores de IgE específica a invertebrados según expresividad clínica .....	117
Tabla IX. Valores de IgE específica a otros mariscos según expresividad clínica .....	120
Tabla X. Características clínicas, demográficas e inmunológicas de los pacientes según edad .....	125
Tabla XI. Sexo y síntomas percibidos tras la ingestión de gamba, según la edad de los pacientes .....	127
Tabla XII. Pruebas cutáneas positivas a invertebrados en los pacientes con PODCCP positiva, según edad .....	131
Tabla XIII. Resultados de los valores de IgE específica de los pacientes con PODCCP positiva según edad .....	136
Tabla XIV. Frecuencia de reconocimiento de epítomos identificados en Lit v 1, Lit v 2, Lit v 3 y Lit v 4 .....	145
Tabla XV. Frecuencia de reconocimiento de epítomos identificados y su correlación con la expresividad clínica .....	151
Tabla XVI. Sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN) y eficiencia de las mediciones de IgE específica .....	151

<b>ANEXOS .....</b>	<b>227</b>
---------------------	------------

Anexo I. Bibliografía publicada en relación con esta tesis .....	229
Anexo II. Currículum vitae .....	230

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>243</b>
------------------------------	------------

# **ABREVIATURAS**



## LISTADO DE ABREVIATURAS

\$: Dólares

µg/mL: Microgramos por mililitro

**A:** Grupo de pacientes con reactividad clínica a gamba

ADN: ácido desoxirribonucleico

AK: Arginin-kinasa

ATP: Adenosin-trifosfato

**B:** Grupo de pacientes sin reactividad clínica a gamba

BSA: Albúmina sérica bovina

**C:** Grupo de pacientes alérgicos a ácaros

CMH-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II

Cols.: colaboradores

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

Curva ROC: Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor

**DFUs:** unidades digitales de fluorescencia

**FAHF-2:** fármaco en fase experimental, basado en una fórmula de hierbas chinas

FBPA: Fructosa bifosfato aldolasa

FCĒRI: Receptores de alta afinidad

FDR: False Discovery Rate

g: gramos

HSA: Albúmina sérica humana

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgG1: Inmunoglobulina G de clase 1

IgG4: Inmunoglobulina g de clase 4

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-25: Interleucina 25

IL-31: Interleucina 31

IL-33: Interleucina 33

ILC2: Linfocitos sin expresión de marcadores en su superficie

IUIS: International Union of Immunological Societies, o Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas

kDa: kiloDaltons

kUA/L ó kU/l: kilounidades por litro

**M:** Grupo de pacientes adultos (mayores de 18 años)

MLC: Cadena ligera de la miosina

mg: miligramos

ml: mililitros

mm: Milímetros

mmol/L: milimoles por litro

**OMS :** Organización Mundial de la Salud

**P:** Grupo de pacientes pediátricos (0-18 años)

pI: Punto isoeléctrico

PM: Peso Molecular

PODCCP: Provocación oral, doble ciego, controlada con placebo

PPB: Protein Printing Buffer o solución proteica para impresión

**RC:** Reactividad cruzada

rpm: revoluciones por minuto

**SAO:** Síndrome de alergia oral

SCP: Sarcoplasmic calcium-binding protein o Proteína ligadora de calcio sarcoplásmico

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis o gel de poliacrilamida para la electroforesis

**TAB:** Test de activación de basófilos

Th0: Linfocitos T colaboradores vírgenes

Th1: Linfocitos T colaboradores tipo 1

Th2: Linfocitos T colaboradores tipo 2

Th9: Linfocitos T colaboradores tipo 9

Th17: Linfocitos T colaboradores tipo 17

T regs: Células T reguladoras

nTregs: células T reguladoras que derivan de forma natural del timo

iTregs: células T reguladoras inducidas o adaptativas

TFI: triosa- fosfato-isomerasa

TGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Tisular tipo  $\beta$

TM: Tropomiosina

TnC: Troponina C

**VPN:** Valor Predictivo Negativo

**VPP:** Valor Predictivo Positivo



# ANGLICISMOS



## ANGLICISMOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS

Para una lectura más fluida del texto, se han utilizado anglicismos a lo largo de esta tesis cuyo significado se especifica a continuación:

*Células Th2 o T helper 2*: Células T colaboradoras de clase 2

*Coomasie Plus Protein Assay*: Experimento con proteína coomasie

*Dot*: Puntos fluorescentes, captadores de IgE, detectados mediante micromatriz.

*Immunoblotting*: Inmunotransferencia

*IUIS*: International Union of Immunological Societies, o Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas

*Microarray*: micromatriz

*PPB*: Protein Printing Buffer o solución proteica para impresión

*Prick*: Prueba intraepidérmica o prueba cutánea para el diagnóstico de la enfermedad alérgica

*Prick-prick* o *prick-by-prick*: Prueba intraepidérmica con el alérgeno en su forma nativa

*RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)*: Célula T normal, regulada tras activación, expresada y secretada

*VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)*: Molécula vascular de adhesión celular tipo 1



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. Alergia a alimentos: su importancia y repercusión en la calidad de vida.**

En las últimas décadas, existe un interés creciente por el estudio, comprensión y avance en el conocimiento de la alergia alimentaria. Es un tema de actualidad en los países occidentales y se ha convertido en un problema importante de salud pública durante los últimos años<sup>(1,2)</sup>, que afecta tanto a niños como adultos, y que supone un motivo de preocupación tanto para profesionales de la salud como para pacientes. Por un lado, hay una percepción general de que la frecuencia y gravedad de la alergia a los alimentos está aumentando, y por otra parte, la población general percibe la alergia a los alimentos como un problema de salud importante que afecta considerablemente a su calidad de vida. Además, en Europa, los individuos alérgicos a alimentos originan al sistema sanitario un coste medio de 927\$ más que aquellos sujetos que no lo son, lo que supone un considerable impacto socioeconómico en los sistemas nacionales de salud de los países desarrollados<sup>(3)</sup>.

Se desconoce con exactitud cuál es la prevalencia de alergia a alimentos, fundamentalmente a causa de las diferencias en el diseño de los estudios y en los criterios diagnósticos en los diversos centros, ya que sólo una minoría es finalmente confirmada con pruebas de provocación oral, lo que dificulta las comparaciones. A pesar del problema que supone la realización de grandes estudios epidemiológicos, sabemos que hasta el 20% de la población refiere síntomas sugestivos que pueden estar relacionados con una alergia alimentaria<sup>(4,5)</sup>.

El aumento de la prevalencia de alergia alimentaria se ha puesto de manifiesto en varias publicaciones en los últimos años. Mientras que estudios previos reflejaban una prevalencia en Europa de entre el 1,4 y el 2,4% en adultos<sup>(5)</sup> y tan variable como entre el 0,3 y el 7,5% en niños, estudios recientes recogen que esta prevalencia es del 4% en niños<sup>(6)</sup> y del 3,7% en adultos en Alemania<sup>(7)</sup>. En Estados Unidos, la prevalencia de alergia a cacahuete en población menor de 18 años se ha triplicado, siendo del 0,4% en 1997 y del 1,4% en 2008<sup>(8,9)</sup>. Refiriéndonos a nuestro país, se han llevado a cabo dos estudios descriptivos multicéntricos, en el que participaron alergólogos de

todo el territorio español auspiciados por la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y con la obtención de datos de más de 4.000 pacientes. El primero se llevó a cabo en 1992, obteniendo una frecuencia de primeras consultas derivadas a un alergólogo por alergia alimentaria del 3,6%<sup>(10)</sup>. El segundo estudio se realizó en 2005, y permitió constatar que esta frecuencia de diagnóstico de primeras consultas se había duplicado, siendo del 7,4% en adultos y del 8% en niños menores de 3 años<sup>(11)</sup>.

Se define como “alergia a alimentos” un efecto adverso originado de una respuesta inmune específica que ocurre de forma reproducible tras la exposición a un alimento<sup>(12)</sup>. Teniendo en cuenta esta definición, se ha observado también un aumento considerable de la gravedad de dichos efectos adversos en los últimos años. En población pediátrica, la aparición de enfermedades como la esofagitis eosinofílica<sup>(13)</sup>, reacciones mediadas por IgE a múltiples grupos de alimentos o incluso asociaciones entre varias enfermedades alérgicas en el mismo paciente obliga en ocasiones a instaurar dietas elementales de aminoácidos, no sólo a lactantes sino también a niños en edad escolar<sup>(14-16)</sup>. Además, la alergia a alimentos es la causa más común de anafilaxia en todos los grupos de edad, que en ocasiones resulta mortal. En Estados Unidos, estudios recientes estimaron que de las 203.000 reacciones alérgicas inmediatas atendidas en los Servicios de Urgencias, 90.000 fueron reacciones anafilácticas<sup>(17)</sup>. En Reino Unido, el número de hospitalizaciones por anafilaxia inducida por alimentos se ha triplicado en la última década<sup>(18)</sup>. En Suecia, se constató que la alergia a alimentos originó el 92% de los casos de anafilaxia en niños<sup>(19)</sup>. En España, la proporción de incidencia de anafilaxia ocurrida por alimentos es de 35,38 episodios por 100.000 habitantes-año, siendo de nuevo el principal causante de anafilaxia también en nuestro país y que ocurre especialmente en personas menores de 35 años<sup>(20)</sup>.

No solamente la prevalencia o la gravedad de las reacciones alérgicas a alimentos han aumentado en los últimos años. Hay evidencias de que también la alergia a ciertos alimentos, como leche, huevo o soja que tradicionalmente se considera resuelta en un alto porcentaje en los primeros años de vida, es ahora persistente en un mayor número de casos<sup>(21)</sup>.



El paciente alérgico a alimentos percibe una calidad de vida inferior que la población general. Es frecuente que este tipo de pacientes no se consideren “enfermos”, sino “sanos”, y “su alergia” sea frecuentemente percibida como una “característica intrínseca” de la persona más que como una patología. Este hecho, añadido a que, como veremos posteriormente, el pilar fundamental del tratamiento consiste en evitar la ingestión del alimento, conducen a un riesgo relativamente alto de padecer más de una reacción alérgica a alimentos a lo largo de la vida por contactos accidentales. Estas reacciones aparecen de forma inesperada, con diverso grado de intensidad, y con frecuencia ocurren en más de una ocasión en un mismo paciente y alteran considerablemente su calidad de vida<sup>(22,23)</sup>. Además, no es posible predecir la cantidad de alimento necesaria para provocar una reacción alérgica y en ocasiones puede aparecer escondido en la composición de otros alimentos (como por ejemplo salsas, productos sintéticos o alimentos precocinados). Así, un “alimento complejo” sería aquél que contiene muchos productos diferentes, ingredientes desconocidos o comidas cocinadas con muy diversos alimentos<sup>(20)</sup>. Estos productos serían los más peligrosos y potencialmente capaces de producir una reacción alérgica debido a una ingestión inadvertida<sup>(19)</sup>.

La legislación en el etiquetado de los alimentos tampoco es clara y difiere de unos países a otros. En España, se encuentra regulado por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, en el Real Decreto 1245/2008 y el 13 de diciembre de 2014 entró en vigor la ley europea que regula la obligatoriedad de informar sobre cada uno de los ingredientes presentes en locales de hostelería<sup>(24)</sup>.

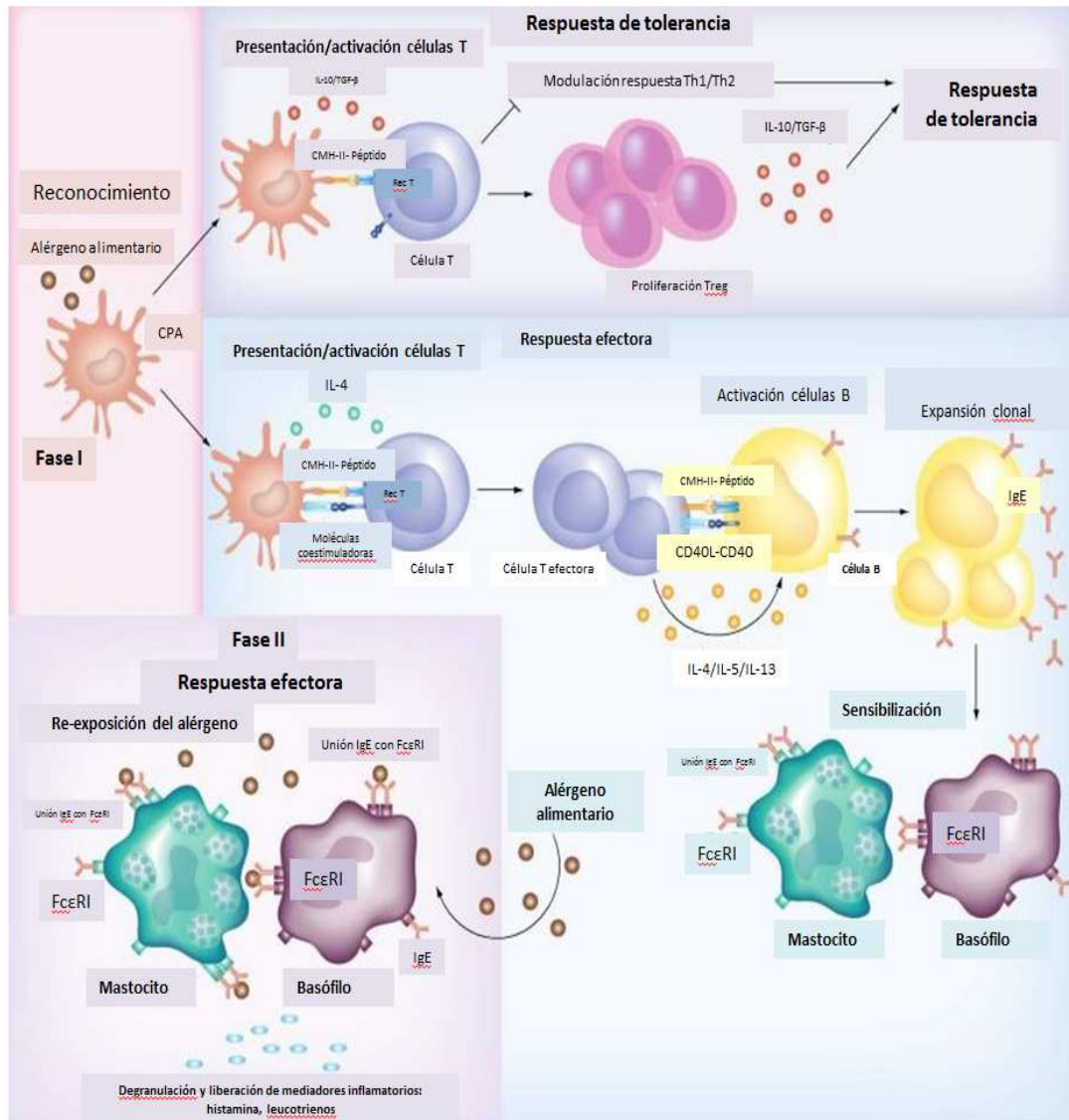
A pesar de este reglamento, en ocasiones los alimentos están definidos por medio de un término científico, como “caseína” en lugar de “leche”, “ovoalbúmina” por “huevo” o “gliadina” en vez de “trigo”, lo que obliga al paciente alérgico a conocer estos términos, leer cuidadosamente el etiquetado de los alimentos y en ocasiones ponerse en contacto con el fabricante<sup>(25)</sup>. Además, el etiquetado puede aparecer de diversas formas: o incluido en la lista de los ingredientes, o en forma de alerta específica, o bien con la fórmula “puede contener”, lo que lleva al paciente a diferentes interpretaciones. De hecho, se ha constatado que el etiquetado poco

conciso es ignorado hasta en el 65% de los casos, incluso en pacientes con historia previa de anafilaxia<sup>(26, 27)</sup>.

Por otra parte, entre los pacientes que han sobrevivido a una reacción moderada o grave, o entre aquellos que han sufrido más de una reacción, el miedo a padecer de nuevo síntomas tras la ingestión de alimentos alcanza tal importancia en su vida diaria que evitan viajes, excursiones o relaciones sociales que impliquen comer fuera de casa, donde suele ser más complicado conocer si alguno de los alimentos que ingiere ha tenido contacto previamente con el alimento que le produce alergia<sup>(28)</sup>.

## 2. La reacción alérgica inmediata

La reacción alérgica inmediata se clasifica de forma general como reacción de hipersensibilidad tipo I, según Gell PGH y Coombs RRA<sup>(29)</sup>.



**Figura 1.** Etapas de la reacción alérgica a alimentos. Adaptado de Gómez E. et al<sup>(30)</sup>

Sin embargo, la reacción alérgica inmediata ocurrirá únicamente si tienen lugar dos fases<sup>(31)</sup>. Figura 1:

- 1) La *primera fase* también se conoce como de "sensibilización y memoria". En ella, los alérgenos se introducen, por medio de las células presentadoras de antígeno (CPA) en el organismo a través de la barrera mucosa o cutánea. Estas células, que son por ejemplo las células dendríticas o los macrófagos,

captan estas moléculas y las transportan hasta los ganglios linfáticos. Las CPA procesan el alérgeno en pequeños fragmentos peptídicos y las muestran en su superficie mediante la unión al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II)<sup>(32)</sup>.

Estos fragmentos peptídicos unidos al CMH-II se unen a los linfocitos T CD4+ circulantes, los activan e inducen su diferenciación hacia células T colaboradoras, también llamadas T helper 2 (Th2), que producen una serie de mediadores, entre ellos interleucina IL-4 e IL-13. Estas interleucinas serán las responsables de la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de Inmunoglobulina E (IgE). Este proceso se conoce como “respuesta dependiente de linfocitos T”.

Simultáneamente se produce la interacción física entre las células T y B gracias a la participación de diferentes moléculas de la superficie celular.

Además, por su parte, las células B circulantes pueden reconocer por sí mismas los antígenos gracias a los receptores que poseen en su membrana, conocidos como Inmunoglobulina (Ig). De esta forma se activan y originan la “respuesta independiente de linfocitos T”.

La IgE producida por las células plasmáticas se une a los receptores de alta afinidad (FcεRI) de los mastocitos. También pueden entrar en la circulación y unirse a los FcεRI de basófilos circulantes y mastocitos presentes en otros tejidos.

Tras esta fase de sensibilización, un remanente de células T y B de memoria sobreviven y pueden responder ante nuevos contactos con el alérgeno.

- 2) La *segunda fase* de la reacción alérgica se conoce como “*Fase Efectora*”. En ella, los mastocitos y basófilos se activan nuevamente como consecuencia de una nueva exposición al alérgeno.

Esta fase consta, a su vez, de dos etapas: reacción inmediata y reacción tardía.

- En la *reacción inmediata*, el alérgeno se une a las regiones Fab de la IgE formando un inmunocomplejo que se une a la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos), concretamente a los receptores Fcε. Tras esta unión, se produce su degranulación y consecuentemente la liberación de los mediadores inflamatorios, entre los que destacan la histamina y los leucotrienos. Estos mediadores inflamatorios son los responsables de los síntomas que ocurren de forma inmediata tras la exposición al alérgeno durante la reacción alérgica como son por ejemplo la rinoconjuntivitis, el broncoespasmo, la urticaria, diarrea, vómitos y/o anafilaxia.
- Posteriormente, al cabo de 4 ó 6 horas se produce una *reacción tardía*, caracterizada por presentar un infiltrado inflamatorio y edema de los tejidos. La degranulación mastocitaria produce un aumento de la permeabilidad vascular, induce la expresión de moléculas de adhesión como la VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) y la secreción de quimiocinas como eotaxina y RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) e IL-5, entre otras, dando lugar al reclutamiento selectivo de eosinófilos, monocitos y linfocitos T y B que amplifican y prolongan la respuesta inflamatoria. Ello implica un infiltrado inflamatorio y edema de los tejidos, por lo que clínicamente se manifiesta en síntomas más persistentes como hiperreactividad bronquial, la obstrucción nasal o el eccema<sup>(31)</sup>.

### **3. Mecanismo inmunológico de la alergia a alimentos**

#### **3.1. Papel de la mucosa intestinal**

Las reacciones de hipersensibilidad a alimentos mediadas por IgE pueden ocurrir después de la exposición al antígeno por diferentes rutas entre las que destacan la vía gastrointestinal, la vía respiratoria y la vía cutánea<sup>(33,34)</sup>.

Sabemos actualmente, que los antígenos de los alimentos pueden pasar a través del epitelio intestinal tanto en su forma nativa como parcialmente digeridos y, por tanto, interaccionar directamente con las células del sistema inmune<sup>(35)</sup>. También se sabe que la absorción de antígenos alimentarios es más significativa en niños que en adultos, con un descenso de las titulaciones de anticuerpos específicos de alimentos a partir del primer año de vida<sup>(36)</sup>, lo que puede ser debido a la maduración del epitelio intestinal<sup>(37)</sup>.

Los mecanismos por los cuales los antígenos alimentarios pueden atravesar el intestino y entrar en contacto con el sistema inmune son varios, siendo los principales la endocitosis o a través de las uniones celulares del epitelio intestinal. Por otra parte, esta absorción puede también producirse mediante células especializadas, llamadas células M, que están localizadas sobre las placas de Peyer y permiten la liberación del antígeno directamente en células linfáticas. Una cuarta forma de absorción ocurre mediante las células dendríticas que alcancen el lumen del intestino y tomen directamente los antígenos alimentarios<sup>(35)</sup>.

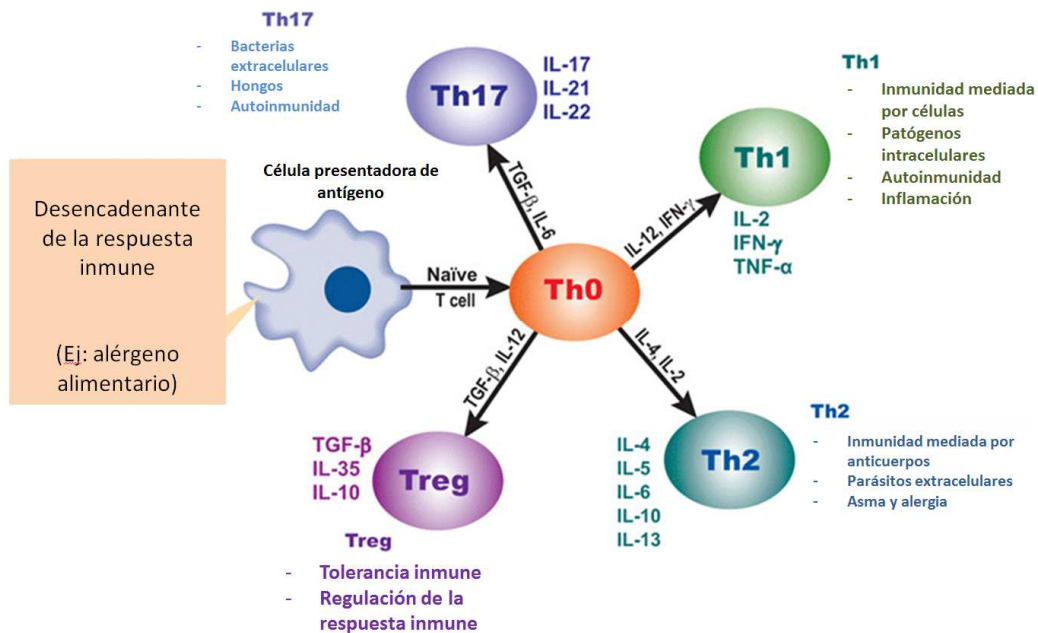
### 3.2. Diferenciación hacia fenotipos Th1 y Th2

Un grupo de proteínas solubles, que regulan la mayoría de las funciones celulares, son cruciales en la cascada de la reacción alérgica. Estas proteínas son las citocinas.

Por tanto, el perfil de citocinas presente en el medio en el que se hallan los linfocitos T vírgenes (Th0), es muy importante para determinar si éstos se diferenciarán para expresar un fenotipo Th1 o un fenotipo Th2.

En la respuesta Th1, una de las citocinas más representativas es el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Su función es promover la diferenciación de células Th0 a Th1 y bloquear por tanto la producción de células Th2. Aparte, produce inhibición de la producción de IgE e IgG1 y estimula la producción de otras subclases diferentes de IgG. El IFN- $\gamma$  también fomenta la producción de IL-12, que promueve la

diferenciación de células Th0 a Th1 y a su vez aumenta la secreción de más IFN- $\gamma$ , cerrando el círculo de retroalimentación de estas citocinas<sup>(33,38)</sup>. Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de la respuesta inmune y liberación de citocinas. Adaptado de: Yoshimura et al<sup>(39)</sup>.

La respuesta alérgica o Th2 se produce preferentemente en un entorno rico en IL-4. Esta citocina estimula la diferenciación de linfocitos Th0 a Th2, así como la producción de anticuerpos IgE e IgG1. Otras citocinas partícipes de la respuesta Th2 son la IL-13, que también promueve la producción de IgE, la IL-5, que estimula la proliferación de eosinófilos, y la IL-9, que participa en la activación de mastocitos. Además, la IL-25, IL-31 e IL-33 se han asociado con la respuesta Th2<sup>(40)</sup>.

El desvío hacia una respuesta Th2 estimula a los linfocitos B para producir IgE específica del alérgeno, ésta se une a los receptores de alta afinidad (Fc $\epsilon$ RI) presentes en la superficie de los mastocitos y basófilos, y tras una nueva ingestión del alérgeno, se produce la segunda fase de la respuesta alérgica descrita anteriormente, conocida como fase efectora<sup>(40)</sup>.

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de células que intervienen en la inflamación Th2, y se conocen como ILC2s. Se trata de un tipo de linfocitos que no expresan en su superficie ningún tipo de marcador y contribuyen a la respuesta

inflamatoria que se observa en enfermedades alérgicas tales como el asma, la rinosinusitis y la dermatitis atópica. Los ILC2s producen de forma muy rápida y eficaz citocinas Th2 tisulares, que se depositan en la piel y superficies mucosas como por ejemplo, el aparato respiratorio. Además, pueden producir la sensibilización de células Th2 y jugar un papel más importante en el desarrollo de las enfermedades alérgicas<sup>(41)</sup>.

Por otra parte, existe una inmunidad denominada “tipo 3” que está mediada por un receptor huérfano, relacionado con el ácido retinoico, que está presente en otro tipo de células T helper, denominadas Th17 y que producen IL17 e IL22. Estas interleucinas activan a los fagocitos mononucleares pero además, reclutan neutrófilos e inducen respuestas epiteliales antimicrobianas. Esta respuesta inmunológica protege al individuo frente a infecciones fúngicas y de bacterias extracelulares.

Las respuestas inmunitarias tipo 1 y tipo 3 son las responsables de las enfermedades autoinmunes, mientras que las tipo 2 pueden originar, como ya se ha visto, enfermedades alérgicas<sup>(42)</sup>.

### 3.3. Células T reguladoras

El modelo del balance Th1/Th2 ha tenido un papel central en la regulación de la respuesta inmune durante mucho tiempo<sup>(43)</sup>. Sin embargo, este modelo no era capaz de justificar los casos en los cuales se producía la inhibición de ambas respuestas (Th2 y Th1), los cuales podrían estar asociados a un estado de tolerancia. Tal situación fue explicada por la actividad de un grupo de células heterogéneo, conocidas como células T reguladoras (Tregs). Las células T reguladoras proceden fundamentalmente de dos linajes, aquellas que derivan naturalmente del timo (nTregs) y las que son inducidas o adaptativas (iTregs), que adquieren funcionalidad después de la estimulación antigénica y en presencia de un perfil de citocinas concreto<sup>(44)</sup>. Las iTregs desempeñan un papel determinante en la respuesta inmune frente a antígenos exógenos. Figura 2.



Las células Tregs han demostrado ser capaces de modular la respuesta alérgica, tanto de forma directa como mediante la producción de citocinas supresoras Th1 y Th2, como la IL-10 y el TGF- $\beta$ , al inhibir células Th1 y Th2<sup>(45)</sup>.

La IL-10 ha sido descrita como esencial en la tolerancia periférica a alérgenos y se le atribuyen, entre otras funciones, la de suprimir la síntesis de IgE, reducir la liberación de citocinas pro-inflamatorias en los mastocitos, inducir la producción de IL-10 en células dendríticas y estimular la producción de IgG4 e IgA<sup>(46)</sup>. El TGF- $\beta$  también puede contribuir a dicha tolerancia al actuar sinérgicamente con la IL-10, reducir la síntesis de IgE, suprimir la funcionalidad de las células Th1, Th2 y Th17, participar en la diferenciación de las células Th2 en Th9 y Th 17, e inducir la síntesis de IgA<sup>(47)</sup>. Se ha visto que estas células Th9 y Th17 están implicadas en procesos inflamatorios<sup>(48,49)</sup>.

Entre las funciones atribuidas a la IL-10 y TGF- $\beta$ , destaca la de estimular la producción de IgA, pues se ha barajado durante mucho tiempo la posibilidad de que el desarrollo de una respuesta alérgica alimentaria pueda estar relacionada con los niveles intestinales de esta inmunoglobulina. De hecho, en modelos animales de alergias alimentarias, se han asociado bajas concentraciones de IgA en el intestino con el desarrollo de tolerancia periférica<sup>(50)</sup>.

Las placas de Peyer están directamente implicadas en la síntesis de IgA, estimuladas por la presencia de IL-10 y TGF- $\beta$ , por tanto, la pérdida de la actividad de las células Tregs podría conllevar a un desbalance hacia la respuesta alérgica Th2.

Todos los individuos, tanto sanos como alérgicos, muestran los tres tipos de las células T específicas del alérgeno (repertorio Th1, Th2 y Treg). Por tanto, es factible que la variación en la proporción de cada uno de los repertorios determine si se desarrolla una respuesta inmune sana o alérgica, marcada por el ratio de células específicas iTreg y Th2<sup>(51)</sup>.

## 4. Alérgenos

### 4.1. Definición

Un alérgeno es aquella molécula capaz de provocar reacciones alérgicas tipo I mediadas por IgE<sup>(52)</sup>. Por lo general, se tratan de moléculas de naturaleza proteica, aunque también se ha asociado capacidad alérgica a los hidratos de carbono<sup>(53,54)</sup>.

Actualmente se desconocen las causas para que una molécula se comporte como un alérgeno. Sin embargo, éstas deben cumplir determinadas características, tales como la estabilidad estructural, pero también son importantes las dosis y la ruta de exposición a dicho alérgeno.

Dentro de una determinada fuente alérgica existen *alérgenos principales o mayoritarios*, reconocidos por más del 50% de los pacientes alérgicos a esa fuente, mientras que los alérgenos reconocidos por menos de dicho porcentaje de pacientes se consideran *alérgenos minoritarios o secundarios*<sup>(55)</sup>.

La zona de los alérgenos que es reconocida por las IgEs son los *determinantes antigénicos o epítomos* IgE, formados por un número variable de aminoácidos, y que pueden ser secuenciales (continuos) o conformacionales (discontinuos). Los epítomos secuenciales, como su nombre indica, están formados por la secuencia lineal de los aminoácidos presentes en la estructura primaria de la proteína, mientras que en los epítomos conformacionales participa la estructura tridimensional del alérgeno, por lo tanto pueden estar formados por aminoácidos muy distantes, pero que se encuentran próximos una vez que la proteína está plegada<sup>(56)</sup>.

### 4.2. Características

Actualmente se desconocen las características estructurales y/o funcionales que hacen que una determinada molécula resulte alérgica, aunque tampoco se tiene la certeza de que existan. A pesar de ello, muchos de los alérgenos descritos

presentan una serie de características físico-químicas comunes que parecen tener importancia en su alergenicidad<sup>(56-58)</sup>:

1. Son proteínas solubles
2. Su peso molecular oscila, generalmente, entre 5 y 70 kDa, lo que les permite el paso a través de las mucosas, y ser capaces de activar la respuesta inmune.
3. Presentan una elevada potencia biológica, de manera que pequeñas cantidades son suficientes para producir reacciones inmediatas en personas sensibilizadas.
4. Contienen epítomos T capaces de inducir una respuesta Th2.
5. Necesitan tener al menos 20 aminoácidos para poseer un mínimo de dos epítomos B que les permitan unirse a los receptores de la IgE.

Los alérgenos alimentarios, además, presentan unas características especiales. Si el alérgeno produce la sensibilización por vía digestiva y se ingiere cocinado, debe ser estable al calor, además debe poseer estabilidad frente al pH ácido y frente a las enzimas proteolíticas, propiedades que favorecen la llegada de la molécula intacta a la superficie de absorción del intestino delgado.

Las propiedades intrínsecas de los alérgenos alimentarios, además de influir en la presentación clínica, repercuten en la calidad de las pruebas diagnósticas empleadas<sup>(59)</sup>.

#### 4.3. Nomenclatura y clasificación

La nomenclatura de los alérgenos inductores de reacciones de hipersensibilidad de tipo I<sup>(60)</sup> se basa en la propuesta de 1986 realizada por la IUIS (International Union of Immunological Societies) y de la OMS (Organización Mundial de la Salud), que fue revisada en 1994<sup>(61)</sup>. Según estos criterios, los alérgenos se nombran utilizando las tres primeras letras del género, la primera letra de la especie (o las dos primeras si pudiese inducir a error) y un número arábigo correlativo, que se refiere al orden de identificación. Así, por ejemplo, Pen a 1 y Hom a 1 se refieren a las tropomiosinas de la gamba *Penaeus aztecus* y de la langosta *Homarus americanus*, respectivamente,

mientras que la tropomiosina de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicalis* se denominan Der p 10 y Blo t 10, respectivamente.

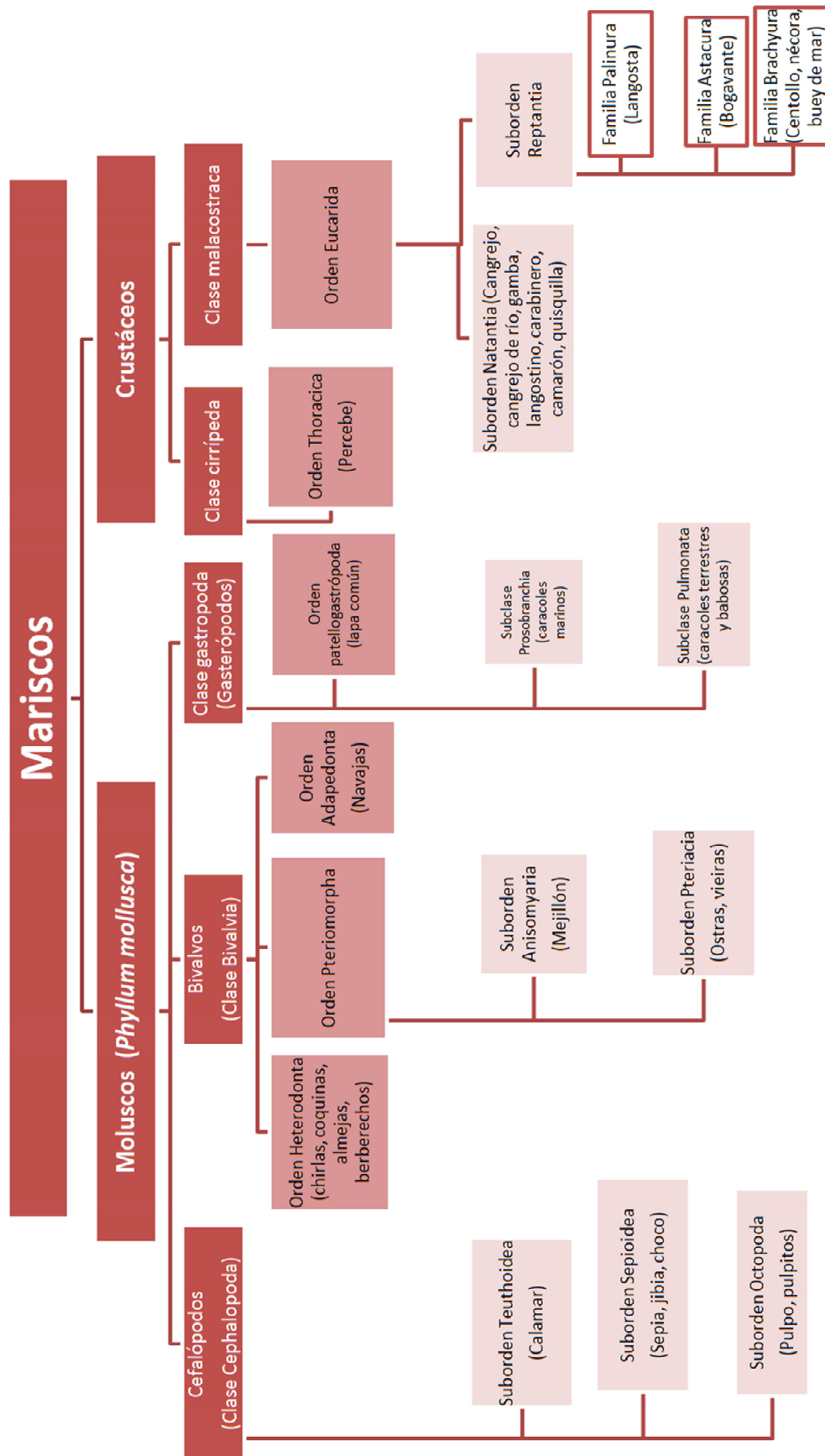
En el año 2003<sup>(62)</sup> se propone una nueva clasificación para los alérgenos alimentarios, realizada en base a la combinación de determinadas características tales como la naturaleza intrínseca de los alérgenos, la vía de sensibilización y los síntomas que su ingestión o inhalación provocan, distinguiendo así dos tipos de alérgenos alimentarios:

- Los alérgenos alimentarios estables, resistentes a temperaturas elevadas, pH ácido y digestión enzimática, que tras su ingestión son capaces de inducir sensibilizaciones mediadas por IgE en individuos genéticamente predispuestos, y que producirán síntomas, frecuentemente sistémicos, en sucesivas exposiciones por vía digestiva. La BLG de la leche, Ara h 1 del cacahuete o Pru p 3 del melocotón<sup>(52,63,64)</sup> son ejemplos claros. Este tipo de alérgenos alimentarios se denominan alérgenos completos<sup>(52)</sup> y este tipo de alergia alimentaria se ha clasificado como alergia de clase I<sup>(65)</sup>, en la que la sensibilización a las proteínas alimentarias ocurre por vía gastrointestinal y es lo que Larramendi<sup>(62)</sup> considera alergia a alimentos primaria.
- Los alérgenos lábiles de los alimentos, no resisten el tratamiento térmico ni la exposición al pH gástrico ni a las enzimas digestivas, por lo que se supone que no son capaces de inducir sensibilizaciones a través de la vía digestiva. Sin embargo, estos alérgenos sí pueden desencadenar síntomas en individuos sensibilizados generalmente por vía respiratoria, y debidos a reactividad cruzada<sup>(64)</sup>. Estos alérgenos alimentarios se llaman incompletos<sup>(52)</sup>, son responsables de la alergia de clase II<sup>(65)</sup> en la que la sensibilización a un aeroalérgeno ocurre por vía respiratoria, y la reactividad cruzada con el alimento provoca los síntomas tras su ingesta. Constituyen la alergia a alimentos secundaria de la clasificación de Larramendi<sup>(62)</sup>. Un ejemplo de este tipo de alergia alimentaria es el SAO (Síndrome de Alergia Oral) producido por el melón en pacientes alérgicos al polen de gramíneas, en los que la sensibilización primaria se produce al alérgeno de las gramíneas, Phl p 12, por

vía inhalada, siendo reconocido secundariamente el alérgeno homólogo en el melón<sup>(66,67)</sup>.

## **5. Alergia a mariscos: su relevancia**

Actualmente, han sido comunicados más de 170 alimentos responsables de reacciones alérgicas mediadas por Inmunoglobulina E (IgE)<sup>(12)</sup>. Los mariscos comestibles que potencialmente pueden producir alergia se esquematizan en la Figura 3. Pertenecen a dos grupos de la escala filogenética: moluscos y artrópodos. Los artrópodos comprenden la clase Crustáceos, dentro de los cuales se incluyen gamba, langostino, camarón, langosta, bogavante, percebe y cangrejo. Los moluscos contienen a la clase cefalópodos (calamar, pulpo o sepia), bivalvos (ostra, almeja, berberecho, mejillón) y gasterópodos (caracol, lapa)<sup>(68)</sup>.



**Figura 3.** Clasificación taxonómica de los mariscos.

La prevalencia de alergia a un alimento determinado viene condicionada fundamentalmente por las costumbres alimentarias de la zona geográfica en la que vive y por los hábitos dietéticos del individuo. Por tanto, la alergia a mariscos es generalmente alta en aquellas comunidades e individuos en las que su consumo juega un papel importante en su dieta. Los principales países consumidores de marisco en el mundo son China, Japón y Estados Unidos<sup>(69)</sup>. De hecho, se estima que el consumo de mariscos ha aumentado aproximadamente un 50% en los últimos 40 años en todo el mundo, debido a su valor altamente nutritivo y el fomento de una dieta sana, lo que se corresponde con el consecuente incremento en la incidencia de alergia alimentaria<sup>(70)</sup>.

A pesar de que en España, debido a la situación financiera actual, el consumo de marisco (crustáceos y moluscos frescos) ha disminuido un 7,3% respecto a años previos, éste sigue siendo elevado. De hecho, el consumo de marisco tanto congelado como en conserva se ha visto incrementado hasta en un 1,7%<sup>(71)</sup>. En el primer semestre de 2013 se han consumido 153.950,12 miles de kilos de marisco en España, de los cuales 18.907,68 miles corresponden a la Comunidad de Madrid<sup>(72)</sup>, tal y como se muestra en la Tabla I. El incremento de su popularidad y frecuencia de consumo se acompaña generalmente de un incremento en el número de reacciones adversas, y viceversa<sup>(73)</sup>.

**Tabla I. Consumo de marisco en España durante el primer semestre de 2013**

C. Autónoma	Consumo (miles de kg)	Consumo per cápita
Andalucía	27.057,20	3,19
Aragón	4.921,04	3,73
Asturias	4.927,99	4,33
Baleares	2.436,74	2,29
Canarias	4.067,29	1,87
Cantabria	2.472,87	4,34
Castilla La Mancha	7.149,42	3,29
Castilla León	9.916,49	3,8
Cataluña	27.219,73	3,92
Extremadura	2.949,88	2,64
Galicia	11.313,55	3,96
La Rioja	926,21	2,98
Madrid	18.907,68	3,08
Murcia	3.821,12	2,52
Navarra	2.002,54	3,1
País Vasco	7.689,07	3,7
Valencia	16.171,29	3,1
<b>Total España</b>	<b>153.950,12</b>	<b>3,32</b>

*Datos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (72)*

La alergia a mariscos está considerada como una de las principales alergias alimentarias<sup>(74)</sup>. Es mucho más frecuente en la edad adulta que en la población infantil. En Estados Unidos, la alergia a crustáceos ocurre en un 0,5% en niños y en un 2,5% en adultos<sup>(12)</sup> y se ha estimado que suponen el 24% de las visitas al Servicio de Urgencias por reacciones alérgicas a alimentos<sup>(75,76)</sup>. Si tenemos en cuenta a todos los grupos de edad, en España, los mariscos constituyen la tercera causa de alergia alimentaria, siendo del 22% y estando precedida únicamente por las frutas (33,3%) y los frutos secos (26%). En cambio, en población menor de 14 años, los mariscos ocupan la 6ª causa de alergia alimentaria, precedidos por leche, huevo, pescado, frutos secos y legumbres<sup>(77)</sup>. Dentro de los mariscos, en España los crustáceos producen el 85,2% de las reacciones, lo que supone el 18,7% de todas las reacciones a los alimentos<sup>(11)</sup>. Además, entre los crustáceos, gamba y langostino son los responsables de la mayor parte de las reacciones alérgicas<sup>(78)</sup>.

Asimismo, los mariscos pueden producir reacciones alérgicas más graves que las que se desencadenan tras la ingestión de otros alimentos<sup>(79)</sup>. En un reciente



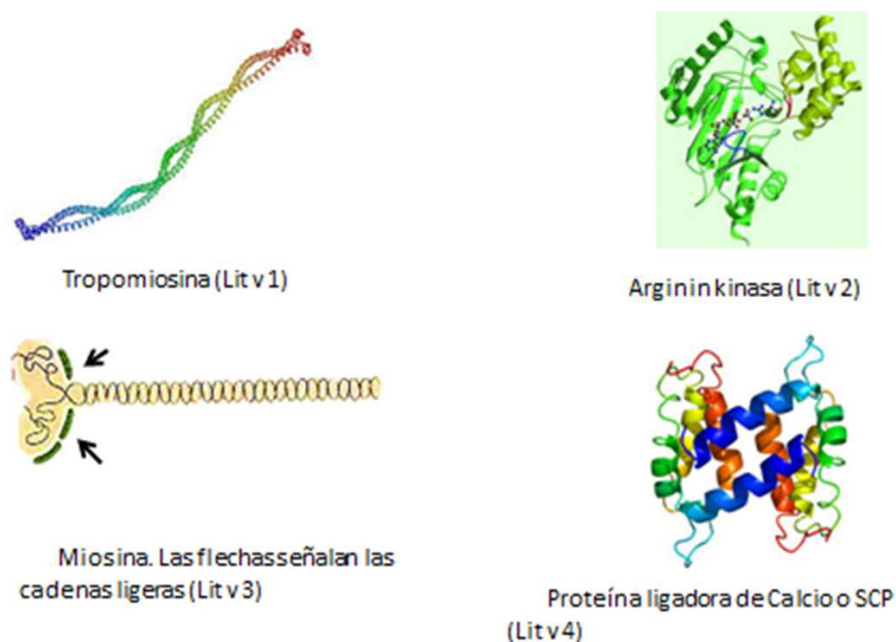
estudio en Madrid, se constató que el 15,83% del total de las anafilaxias sufridas por la población eran producidas por los mariscos<sup>(20)</sup>.

## **6. Características específicas de la alergia a gamba**

Actualmente, la alergia a gamba se considera una enfermedad de larga duración, generalmente persistente a lo largo de toda la vida y que puede asociarse a reacciones graves, incluyendo anafilácticas<sup>(80)</sup>. Además, debido a las características de las proteínas responsables de la alergia a marisco, no es infrecuente que los pacientes perciban síntomas no sólo tras la ingestión del alimento, sino también tras el contacto cutáneo, durante la exposición a los vapores de cocción o que los síntomas ocurran en ambientes donde se haya cocinado previamente el crustáceo.

De hecho, a pesar de que en otros alimentos como la leche o el huevo, el procesado mediante el calor disminuye la capacidad de producir reacciones alérgicas, en el caso de la gamba ocurre lo contrario. Esto se debe a la reacción de Maillard, que para que tenga lugar precisa ser inducida por el calor. La reacción produce una glicación en las proteínas que aumenta su alergenidad. Por tanto, la capacidad de una proteína de producir una reacción alérgica viene condicionada por sus propiedades, su estructura conformacional y su interacción con otras proteínas, carbohidratos o ácidos grasos<sup>(81)</sup>.

Entre las proteínas responsables de alergia a gamba, existen varios alérgenos indentificados. Los más importantes son cuatro, todos ellos procedentes de la región muscular del crustáceo. Figura 4.



**Figura 4.** Proteínas alergénicas de gamba

#### 6.1. Tropomiosina:

La primera proteína alergénica identificada en el marisco fue la tropomiosina siendo ésta la única proteína caracterizada como alérgeno mayoritario en el marisco.

Hoffman DR y cols.<sup>(82)</sup> fueron los primeros en identificar y caracterizar parcialmente los alérgenos de gamba. La forma en que lo hicieron fue tras aislar el antígeno II de un extracto de gamba cocida, y detectando que el 100% de la población estudiada presentaba IgE específica frente a esta proteína. Este antígeno II era una glicoproteína termoestable de 38 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) de 5,4 a 5,8. Está compuesta de 341 aminoácidos y con un contenido de carbohidratos del 4%. Estos mismos autores también aislaron el antígeno I, pero éste procedía de un extracto de gamba crudo. El antígeno I se trataba de una proteína ácida termolábil de 21 kDa, con un pI de 4,75-5, 189 aminoácidos y 0,5% de contenido de carbohidratos, siendo capaz de unir IgE en 7 de los 11 individuos estudiados<sup>(82)</sup>.

Posteriormente Shanti KN y cols.<sup>(83)</sup> identificaron dos proteínas alergénicas del extracto de la gamba cocida *Penaeus indicus*: Sa-II de 34 kDa, con 301 aminoácidos y aparentemente similar al antígeno II identificado por Hoffman DR; y Sa-I, de 8,2 kDa, termoestable y que no fue caracterizado. El antígeno Sa-II se identificó como tropomiosina de la gamba *P. indicus* denominándose Pen i 1.

Daul CB y cols. identificaron la tropomiosina de la gamba marrón *P. aztecus*, Pen a 1, proteína muscular de 36 kDa, compuesta por 312 aminoácidos y 2,9% de carbohidratos<sup>(84)</sup>.

Tanto el antígeno I, SA-II y Pen a 1, parecen ser la misma proteína dado que sus pesos moleculares, composición de aminoácidos y reactividad IgE son muy similares.

Estudios posteriores de alergia a diferentes mariscos han identificado esta proteína en distintas especies de gambas y mariscos, demostrando que la tropomiosina es el alérgeno mayoritario responsable de la alergia al marisco<sup>(85,86)</sup>.

La tropomiosina es por tanto una proteína termorresistente, ácida y de una secuencia de 284-312 aminoácidos, con una homología del 93-100% de secuencia proteica entre las tropomiosinas de diferentes especies de gambas.

Los péptidos de unión de IgE del alérgeno Pen a 1 han sido aislados y caracterizados por Reese G y cols.<sup>(87)</sup> localizándose tanto en la parte filogenéticamente variable, como en la conservada. A partir de la gamba *Metapenaeus ensis*, también ha sido posible caracterizar dos péptidos de unión a las células B-IgE específicos, correspondientes a las secuencias de aminoácidos 46-63 y 150-158, y un epítipo de unión a células T, péptido 4, correspondiente a la secuencia de aminoácidos 261-281<sup>(88)</sup>.

La tropomiosina se ha identificado en numerosas especies de invertebrados, no sólo en los artrópodos, sino también en moluscos como el pulpo<sup>(89)</sup>, calamar<sup>(90)</sup>, ostras<sup>(91)</sup> y también en nematodos como el *Anisakis simplex* o *Ascaris lumbricoides*<sup>(92,93)</sup> siendo uno de los panalérgenos más importantes dentro de los alérgenos de origen animal.

Como se ha explicado antes es el primer alérgeno detectado, el que ha sido estudiado con más profundidad, y también el más importante por considerarse alérgeno mayoritario. Es la proteína responsable de producir reacciones en al menos el 80% de los pacientes alérgicos a gamba, uniéndose además aproximadamente al 75% de la IgE específica a gamba en los pacientes alérgicos<sup>(94)</sup>. Fue identificado en 1994 en la gamba marrón (*Penaeus aztecus*) y se le dio el nombre de Pen a 1<sup>(84)</sup>, en la gamba tigre (*Penaeus monodon*) y se nombró como Pen m 1 y en la gamba blanca del pacífico (*Litopenaeus vannamei*), conociéndose como Lit v 1<sup>(95)</sup>. Es una proteína cuya función es la contractilidad muscular, está formada por 284 aminoácidos, su peso molecular se encuentra entre 34 y 38 kDa, es termoestable y está presente además en otros crustáceos como la langosta, cangrejo y moluscos (caracol, ostra), en los que también está considerado alérgeno mayoritario, y en otros invertebrados (ácaros, cucaracha, parásitos o mosquito) en los que se considera alérgeno minoritario<sup>(93)</sup>. Esta presencia global de la tropomiosina origina a que clásicamente se la considere responsable de los fenómenos de reactividad cruzada. Dando un paso más en el estudio molecular de la proteína, se han identificado también los péptidos de la tropomiosina que unen IgE en un mayor porcentaje de pacientes. Estas regiones específicas de la proteína se conocen como “epítomos”<sup>(96)</sup>.

## 6.2. Arginin-kinasa

El segundo alérgeno identificado en el marisco es una proteína con actividad energética, la arginin kinasa (AK). Se conoce en la nomenclatura internacional de alérgenos como Pen m 2 o Lit v 2. Es un alérgeno minoritario descrito por primera vez en 2003<sup>(97,98)</sup>. Yu CJ y cols.<sup>(97)</sup> identificaron, aislaron y clonaron la secuencia de 356 aminoácidos de este nuevo alérgeno de la gamba *Penaeus monodon* (Pen m 2) de 40 kDa y pI 6,0. Es una proteína abundante en el músculo de la gamba y muy similar a la de otros crustáceos: cigala (*Procambarus clarkii*) y langosta (*Homarus gammarus*), con una identidad de secuencia del 90% y con el cangrejo (*Limulus polyphemus*) la homología es del 77%. En este trabajo, demuestran que la tropomiosina Pen m 1 es el

alérgeno mayoritario de esta gamba, mientras que la arginin kinasa parece ser importante como alérgeno sólo para alguno de estos pacientes (27%).

Esta proteína se identificó por primera vez como alérgeno en la polilla *Plodia interpunctella*<sup>(99)</sup> demostrando además mediante ensayos de inhibición que esta proteína purificada era capaz de inhibir la unión de IgE a las proteínas de peso molecular (PM) equivalente a la arginin kinasa (40 kDa) de los extractos de ácaro, cucaracha, langostino, langosta y mejillones, y definiéndolo por tanto como un nuevo panalérgeno en los invertebrados.

Además, esta proteína se ha identificado como alérgeno en otros crustáceos tales como el cangrejo (*Charybdis feriatus* y *Portunus pelagicus*)<sup>(100)</sup>, en diferentes artrópodos como *Blatella germanica* (Bla g 9), *periplaneta americana* (Per a 9)<sup>(101)</sup>, arañas (*Holocnemus pluchei*)<sup>(102)</sup>, mosquito (*Aedes aegypti*), en nematodos como el gusano de seda (*Bombyx mori*) y en moluscos como el pulpo (*Octopus fangsiao*)<sup>(103)</sup>.

La arginin kinasa de los crustáceos se caracteriza por ser una proteína termolábil y volátil, propiedades que explican los elevados niveles detectados en los aerosoles de los cocederos de marisco. Por lo tanto, la arginin kinasa es la responsable de la sensibilización de pacientes con asma ocupacional dentro de la industria marisquera<sup>(104)</sup>.

En cuanto a su función, participa en la contractilidad muscular como almacenaje y transporte de energía, al formar fosfoarginina mediante la catalización de la transformación de adenosín trifosfato (ATP) en arginina.

### 6.3. Cadena ligera de la miosina

La cadena ligera de la miosina (MLC) recibió el nombre de Lit v 3. Fue descrita en 2008<sup>(80)</sup>, con un peso molecular de 20 kDa y es reconocida por más del 50% de los pacientes alérgicos a gamba. Está formada por 177 aminoácidos y participa también en la contractilidad muscular. Esta proteína pertenece a la superfamilia de proteínas

que se mueven a lo largo de los filamentos de actina mientras hidroliza la adenosina trisosa-fosfato. La miosina es una proteína muscular formada por dos cadenas pesadas cada una de las cuales posee un dominio globular (motor) que interacciona con la actina, mientras que las colas de estas cadenas pesadas forman un dímero enrollado, y por dos cadenas ligeras, cada una de 20 kDa enrolladas alrededor de cada cadena pesada de la miosina. La fosforilación de las cadenas ligeras de miosina modifica la conformación de la miosina produciendo la contractilidad muscular.

Esta proteína ha sido descrita como alérgeno en otros crustáceos, como cangrejo (Cra c 5), langosta (Hom a 3) y cucarachas (Per a 8 y Bla g 8)<sup>(105)</sup>.

En un estudio de un caso clínico se ha identificado la proteína Lit v 3 como alérgeno del pollo, siendo la primera vez que se describe una proteína de origen muscular como alérgeno de vertebrados<sup>(106)</sup>.

#### 6.4. Proteína ligadora del calcio sarcoplásmico

La proteína ligadora de calcio sarcoplásmico (SCP) es una proteína de 20 kDa y 174 aminoácidos, que también participa en la contractilidad muscular. Se conoce como Lit v 4 y fue identificada en 2008<sup>(107)</sup>.

También se ha identificado en el cangrejo rojo de río *Procambarus clarkii*<sup>(108)</sup>.

Presenta una homología de secuencia del 80-100% entre las proteínas ligadoras de calcio sarcoplásmico de gambas y otros crustáceos<sup>(109)</sup> es una proteína termoestable del tipo EF-Hand<sup>(110)</sup> como las parvalbúminas. Son proteínas presentes en el músculo implicadas en el proceso de relajación de éste, y responsables de la unión del calcio<sup>(111)</sup>. Estas proteínas se caracterizan por una estructura de doble hélice unida por un bucle, muy conservada, que le permite al motivo EF-hand la unión covalente de 2 cationes divalentes,  $\text{Ca}^{2+}$  ó  $\text{Mg}^{2+}$ <sup>(112)</sup>. Los sitios de unión al calcio resultan imprescindibles tanto para la estabilidad conformacional de la proteína como para su alergenicidad<sup>(113)</sup>.

### 6.5. Otros alérgenos descritos

- *Troponina C y triosa- fosfato-isomerasa*

Estos dos alérgenos han sido recientemente identificados como alérgenos de la gamba *Crangon crangon*<sup>(114)</sup>.

- La Troponina C (TnC) forma parte del complejo de troponina, el cual está formado por 3 subunidades: TnT, que se une a la tropomiosina, TnI, que cubre el punto activo de la actina, el cual interactúa con la miosina, y la TnC que tiene afinidad por el ión de calcio. Esta proteína, junto con la tropomiosina, está implicada en la contracción muscular, de forma que cuando el calcio se fija a la troponina C, se produce un cambio en la posición de la tropomiosina que descubre los sitios de la actina donde se va a fijar la parte globular de la miosina.

Esta proteína de 28 kDa, ha sido identificada como alérgeno en el nematodo *A. simplex*<sup>(92)</sup> en la cucaracha *B. germanica* Bla g 6<sup>(115)</sup> y en el ácaro *Tyrophagus putrescentiae*, presentando una homología de secuencia entre los artrópodos del 62,7-85,5%<sup>(116)</sup>.

- La triosa- fosfato-isomerasa (TFI) es una enzima implicada en el metabolismo del mio-inositol, que ha sido identificada como alérgeno en diferentes especies vegetales, como látex<sup>(117)</sup>, sandía<sup>(67)</sup> y harina de trigo<sup>(118)</sup> al igual que en especies animales como en el mosquito *Forcipomyia taiwana*<sup>(119)</sup> en el salmón<sup>(120)</sup> y en el lenguado<sup>(121)</sup> además de en la cucaracha *B. germanica*<sup>(122)</sup>.

- *Hemocianina*

Se ha descrito recientemente como nuevo alérgeno de la especie de gamba gigante de agua dulce de PM alrededor de 60-80 kDa, identificándose como homólogo a la proteína hemocianina<sup>(123)</sup> la cual se ha descrito previamente como alérgeno de la cucaracha *P. americana*<sup>(124)</sup> y como potencial alérgeno del caracol (*Helix aspera* y *H. pomatia*) y del ácaro *D. pteronyssinus*<sup>(125)</sup>.

Se ha descrito también como alérgeno existente en el cefalotórax de gamba<sup>(126)</sup>.

- *$\alpha$ -Actinina*, con un peso de 94 a 99 kDa
- *$\beta$ -Actina*, de 46 kDa
- *Fructosa bifosfato aldolasa*, FBPA, de 43 kDa<sup>(127)</sup>
- *Ubiquitina*, de 5 a 7 kDa
- *Enolasa*
- Alérgenos presentes en el ovario, y que pueden verse modificados según el desarrollo ovárico: *Vitelogenina* y *Proteína 14-3-3*<sup>(128)</sup>.

## 7. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada (RC) es un proceso que ocurre cuando, tras una sensibilización a un alérgeno, se produce una síntesis de anticuerpos IgE específica, que posteriormente pueden reconocer antígenos presentes en proteínas homólogas procedentes de otras fuentes alérgicas.

Las proteínas conservadas filogenéticamente son más proclives a presentar RC. Estas proteínas, al poseer una estructura molecular y de secuencia muy similar, tienen mayor posibilidad de compartir epítopos secuenciales y conformacionales. Para que exista RC es necesaria una homología de secuencia superior al 35% en una longitud de 80 aminoácidos o al menos identidad en 8 aminoácidos contiguos, aunque también se han descrito casos de RC entre alérgenos con tan sólo un 35% de homología de secuencia<sup>(129)</sup>.

Por tanto, y aunque no haya previa exposición al alérgeno, un individuo puede reaccionar frente a éste con clínica de alergia inmediata debido a una sensibilización preexistente a un alérgeno altamente homólogo<sup>(130)</sup>. Sin embargo, a veces este reconocimiento del alérgeno no ocasiona síntomas clínicos, por lo cual el sujeto presentaría únicamente sensibilización por un fenómeno de RC frente al alérgeno en cuestión.



Los panalérgenos son proteínas ubicuas en la naturaleza, no relacionadas taxonómicamente y que presentan fenómenos de RC.

Entre los alimentos de origen animal, algunos de los panalérgenos hasta ahora descritos son:

- *Parvalbúmina*, el alérgeno principal de diferentes especies de pescado y responsable de la RC entre peces y anfibios<sup>(131)</sup>.
- *Tropomiosina*: alérgeno principal descrito en mariscos, concretamente en diferentes especies de gambas, camarones, langostas, insectos y otros crustáceos<sup>(83, 85)</sup>. Es el panalérgeno responsable de la RC entre mariscos, insectos (cucarachas) arácnidos (ácaros) y otros parásitos.

Las tropomiosinas comparten una homología de secuencia entre las distintas especies de gamba del 93 al 99% y entre otros artrópodos la homología es del 75 al 80%<sup>(132)</sup> aunque en función de la especie pueden poseer diferentes epítomos IgE<sup>(133)</sup>. Se ha demostrado la existencia de RC entre las especies *S. melantho* y *P. monodon* con la del ácaro *D. pteronyssinus*.

### 7.1. Reactividad cruzada con ácaros: síndrome ácaros-mariscos

Los ácaros son animales microscópicos que pertenecen al *phylum* de los artrópodos. Se encuentran en el polvo doméstico y son la primera causa de sensibilización alérgica y de asma bronquial en gran parte del mundo. En España, la sensibilización a ácaros que presentan los pacientes con rinitis y/o asma difiere enormemente de unas comunidades autónomas a otras, siendo del 7,1% en Aragón y de hasta un 71,9% en las Islas Canarias. En el caso de la Comunidad de Madrid es de 12%, lo que se considera una prevalencia baja<sup>(134)</sup>. El género de ácaros más importante desde el punto de vista alergológico es el *Dermatophagoides*, del que se han descrito 12 grupos distintos de alérgenos, entre los que destacan el Der 1 y el Der 2 como mayoritarios<sup>(135)</sup>.

Las sensibilizaciones simultáneas a dos o más fuentes alergénicas, incluso siendo una de ellas respiratoria y la otra alimentaria, tienen lugar con una frecuencia

mayor de lo que cabría esperar y se puede justificar por el fenómeno de reactividad cruzada<sup>(135)</sup>. Estudios realizados en poblaciones con tasas elevadas de sensibilización a ácaros muestran unas cifras más elevadas de prevalencia de alergia a mariscos<sup>(136)</sup>. Además, prácticamente la totalidad de los pacientes sensibilizados o alérgicos a mariscos muestran pruebas positivas con ácaros, tengan o no relevancia clínica. Esta asociación de alergia respiratoria a ácaros y alergia a mariscos es muy significativa y se conoce como síndrome de alergia a ácaros-mariscos<sup>(137)</sup>.

Clásicamente, la tropomiosina se considera un alérgeno importante en los ácaros de polvo doméstico (Der p 10 y Der f 10) y la responsable de la etiopatogenia de este síndrome, y por tanto, de la reactividad cruzada entre ácaros y mariscos<sup>(132,138)</sup>. Sin embargo, en los últimos años varias publicaciones<sup>(139,140,141)</sup> muestran que la tropomiosina no parece justificar esta reactividad cruzada y ha sido sugerida como responsable la arginin-kinasa<sup>(127,142)</sup>.

Se han descrito hasta 23 alérgenos en los ácaros, cuya frecuencia de reconocimiento varía considerablemente, al menos en ciertas poblaciones, por lo que otros alérgenos podrían estar implicados en la reactividad cruzada entre marisco y ácaros.

Se han propuesto como proteínas responsables de la reactividad cruzada entre ácaro y gamba una proteína de alrededor de 20 kDa y otras de elevado peso molecular<sup>(135,137)</sup>.

En el síndrome de alergia ácaros-gamba suele deberse a una previa sensibilización a ácaros, aunque en algunas ocasiones también se debe a una previa sensibilización a los crustáceos. Esto depende del origen del paciente, de su edad, la dieta y el ambiente.

En una tesis doctoral reciente de la Dra. Gámez se describe perfectamente que en un clima continental seco como Madrid, la  $\alpha$ -actinina,  $\beta$ -actina, FBPA, tropomiosina y SCP eran las proteínas alergénicas más importantes de la gamba, sin embargo para la población con clima húmedo como Lugo, lo era la proteína identificada como ubiquitina. Al comparar el porcentaje de reconocimiento de las

proteínas de extracto de ácaro con peso molecular equivalente en las proteínas identificadas en la gamba *Solenocera Melantho*, se observó que en el extracto de ácaro las proteínas más relevantes eran la tropomiosina y la  $\alpha$ -actinina en la población de clima continental, y la ubiquitina en la población de clima húmedo. Estos resultados indican que dichas proteínas podrían estar implicadas en la reactividad cruzada entre gamba y ácaro, y lo confirmaron con ensayos de inhibición.

Además se confirmó mediante ensayos de inhibición cruzada que para la población con clima húmedo el sensibilizante primario resultó ser el ácaro y para la población con clima continental seco lo era la gamba.

En esta tesis se obtiene un extracto de gamba hipoalergénico en el que se llevan a cabo dos aproximaciones experimentales: tratamiento térmico y digestión gástrica simulada in vitro. Se observa que el tratamiento térmico no modificaba la reactividad IgE de las proteínas de la gamba respecto al extracto de la gamba sin tratar. Sin embargo, la digestión del extracto de gamba in vitro con pepsina produjo una disminución en la capacidad de unir IgE respecto al extracto sin digerir. También se comparó la alergenicidad de ambos extractos, sin digerir y digerido, mediante pruebas in vivo y ex vivo. Para ello se realizaron pruebas intraepidérmicas, las cuales mostraron que el extracto de gamba digerido producía pápulas de menor tamaño que las producidas por el extracto sin digerir, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Además, se analizó la actividad alérgica de ambos extractos mediante test de activación de basófilos (TAB). Cuando los basófilos de pacientes sensibilizados a gamba se incubaban con el extracto digerido de gamba, el porcentaje de basófilos activados disminuía significativamente en comparación con el extracto sin digerir. Los ensayos de proliferación de linfocitos T con ambos extractos, demostraron que el extracto digerido de gamba conservaba los epítomos T. También se demostró que este extracto hipoalergénico era capaz de producir anticuerpos IgG en conejos inmunizados con dicho extracto, los cuales eran capaces de inhibir la unión de IgE de los pacientes a las proteínas de gamba<sup>(143)</sup>.

La inmunoterapia como tratamiento para la alergia alimentaria presenta una tasa elevada de reacciones adversas. Por tanto es necesario desarrollar un

tratamiento efectivo y seguro para mejorar la tasa de reacciones que hay en el momento actual. El tratamiento con pepsina podría ser un buen método para reducir la alergenidad de la gamba y así obtener una vacuna efectiva y segura para el tratamiento de la alergia a marisco en general, y en gamba en particular<sup>(144)</sup>.

## 7.2. Reactividad cruzada con otros invertebrados

Aunque con menor frecuencia, también se ha descrito reactividad cruzada entre la alergia a gamba y la alergia a otros invertebrados, como por ejemplo parásitos (*anisakis*), cucaracha o mosquito. En todos ellos uno de los alérgenos descritos es la tropomiosina.

- *Anisakis*: El alérgeno mayoritario del anisakis es el Ani s 1. La tropomiosina del anisakis corresponde con el Ani s 3, pero parece ser marcador de reactividad cruzada y su significancia clínica es realmente escasa<sup>(145)</sup>.
- Cucaracha (*Blatella*): La tropomiosina está descrita como alérgeno en la cucaracha y se conoce con el nombre de Bla g 7. La importancia de la sensibilización a tropomiosina en la alergia respiratoria a cucaracha ha sido descrita recientemente, pero se limita únicamente a determinadas subpoblaciones de pacientes<sup>(146)</sup>.
- Mosquito (*Aedes comunis*): La alergia a picadura de mosquito se produce por alérgenos presentes en la saliva y glándulas salivares del insecto, por lo que la tropomiosina, proteína muscular, no es un alérgeno relevante. La tropomiosina del mosquito se conoce en la nomenclatura de alérgenos como Aed a 7<sup>(147)</sup>.

## 8. Métodos diagnósticos en la alergia a marisco

Prácticamente la totalidad de las reacciones alérgicas a marisco están mediadas por IgE. Por eso, los medios de los que disponemos para diagnosticar alergia a marisco están basados en demostrar la existencia de anticuerpos frente a esta clase de inmunoglobulina.

Las pruebas diagnósticas se realizan ante una sospecha clínica de posible alergia alimentaria. Habitualmente, cuando el marisco es el responsable, existe una relación temporal próxima entre la ingestión y el inicio de los síntomas, aunque en ocasiones, las reacciones se desencadenan también por el contacto del alimento con la piel, por la proximidad del alimento, o a través de la inhalación de humos o vapores durante la cocción<sup>(148,149)</sup>.

En la actualidad, para el correcto diagnóstico es imprescindible la realización de una historia clínica detallada. Los síntomas clínicos comprenden un amplio rango de gravedad que abarca desde prurito oral o urticaria localizada, vómitos, dolor abdominal, rinoconjuntivitis, urticaria generalizada o broncoespasmo pudiendo presentar anafilaxia y shock anafiláctico que compromete la vida del paciente.

La demostración de anticuerpos IgE específicos frente al marisco, se realiza mediante prueba intraepidérmica o prick, que es el método de elección por su sencillez, su bajo coste y su seguridad. Sin embargo, únicamente detectan sensibilización a un alimento, sin que se pueda predecir su importancia clínica. Su tasa de falsos positivos y negativos para el diagnóstico de alergia y/o significación clínica es relativamente alta, dependiendo de características del propio paciente o incluso de la fuente alergénica o el extracto utilizado. De hecho, su rentabilidad con los alimentos o extractos completos es muy variable<sup>(150)</sup>. En el caso concreto de la gamba, el prick tiene una eficiencia diagnóstica del 65,7%, lo que obligaría a tratar como alérgicos de forma innecesaria a una gran cantidad de pacientes<sup>(150)</sup>. Las pruebas intraepidérmicas realizadas con alimento fresco se conocen como prick-prick o prick by prick y consisten en puncionar primero el alimento fresco a estudio con la

lanceta y posteriormente la piel del paciente. Sus resultados se valoran con los mismos criterios y controles negativo y positivo de las pruebas intraepidérmicas con extracto comercial<sup>(151)</sup>. Esta técnica tiene mejor concordancia con las pruebas de provocación o exposición a los alimentos que las pruebas intraepidérmicas realizadas con extractos comerciales<sup>(152)</sup>.

La determinación de IgE específica presenta, en cambio, valores predictivos y de sensibilidad y especificidad superiores al 95%, aunque estas cifras, de nuevo, pueden variar según el extracto utilizado. En el caso de la IgE específica a gamba, su eficiencia diagnóstica es de 74,2%<sup>(153)</sup>. La utilización de alérgenos recombinantes o sus fracciones, y el trabajo con epítomos fijadores de IgE, podrían seleccionar los anticuerpos IgE clínicamente más relevantes y, por tanto, incrementar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de alergia a alimentos. Varias publicaciones sugieren que la determinación de IgE específica frente a tropomiosina de gamba aumenta la eficiencia diagnóstica hasta valores de 88,5%<sup>(139,153,154)</sup>. Aunque existen datos sobre el mapa epitópico de los alérgenos de alimentos como leche<sup>(155)</sup> y huevo<sup>(156)</sup>, son escasos los estudios en mariscos, especialmente su correlación con las características clínicas de los pacientes alérgicos a gamba.

En 1988, Daul CB y cols. publican que el diagnóstico definitivo de alergia a marisco sólo se establece mediante pruebas de provocación<sup>(157)</sup>. Las pruebas de tolerancia o pruebas de provocación consisten en administrar al paciente, en cantidades crecientes, el alimento sospechoso de desencadenar la reacción alérgica. Es fácil entender que esta prueba entraña un riesgo elevado de producir síntomas que pueden llegar a ser graves e incluso mortales, lo que supone una carga emocional y estrés para el paciente y requiere un gasto importante de recursos sanitarios, humanos y económicos<sup>(158)</sup>. Sólo una minoría de las reacciones referidas por los pacientes puede confirmarse con un estudio alergológico completo que incluya provocaciones orales, ya sea por limitaciones en los medios disponibles por el alergólogo o por contraindicación del propio paciente (reacciones anafilácticas previas, riesgo elevado de padecer anafilaxia, enfermedades cardiovasculares, tratamiento con beta-bloqueantes, por ejemplo). Por eso actualmente, pese a que han transcurrido más de 25 años tras la publicación de Daul CB y cols., y a pesar de

los grandes avances en el estudio molecular de alérgenos, la principal demanda del alergólogo clínico que trabaja con alergia a alimentos es el hallazgo de una prueba diagnóstica exenta de riesgo para el paciente, que sustituya a la prueba de provocación como *gold standard* o prueba patrón oro del diagnóstico. Un paso intermedio sería la búsqueda de parámetros (como por ejemplo la concentración de IgE sérica, o el diámetro de pápula obtenido en las pruebas cutáneas) predictivos de un resultado positivo o negativo en la prueba de provocación. Estos estudios se han realizado en cacahuete<sup>(159)</sup>, huevo<sup>(160)</sup>, leche<sup>(161)</sup> y pescado<sup>(162-164)</sup>, pero no se han obtenido datos concluyentes sobre los perfiles de sensibilización que pueden relacionarse con un mayor riesgo de padecer una reacción alérgica frente al marisco.

## 9. La tecnología del microarray o micromatriz

La tecnología por microarray ha sido utilizada ampliamente durante las dos últimas décadas para el estudio de la expresión y regulación genética<sup>(165)</sup>. Además, y debido a su alto rendimiento y su capacidad para analizar simultáneamente muchos objetivos diferentes, el microarray se aplica a estudios alergológicos desde 2002 para la medición cuantitativa de niveles de IgE alérgeno-específicos<sup>(166)</sup>.

El sistema de microarray se adaptó en 2004 por Shreffler W y cols. para el estudio de epítomos secuenciales alergénicos. La importancia del reconocimiento epitópico en pacientes alérgicos ha sido ampliamente demostrada en pacientes alérgicos a leche, huevo o cacahuete, ya que puede implicar la diferenciación hacia un fenotipo de pacientes con alergia persistente, con reactividad clínica o con mayor gravedad de los síntomas clínicos<sup>(155,167,168)</sup>.

Estudios recientes sugieren que la sensibilización clínica tiene una buena correlación con el reconocimiento de epítomos específicos. Por ejemplo, se pudo

comprobar que pacientes con alergia persistente o con una historia de reacciones graves a leche<sup>(155,167)</sup>, cacahuete<sup>(168)</sup> y huevo<sup>(156)</sup> reconocían un número mayor de epítomos secuenciales de IgE específica. El mapa epitópico de IgE podrá llegar a ser una herramienta adicional para el diagnóstico y pronóstico de alergia. Además, la caracterización de epítomos alergénicos puede ayudarnos a comprender mejor la patogénesis y la evolución de la alergia alimentaria.

Con el desarrollo de la tecnología de microarray<sup>(166,169)</sup> y la evolución de las técnicas de síntesis peptídica<sup>(170)</sup>, se han aplicado inmunoensayos con péptidos basados en microarray para el mapa epitópico de varios alérgenos alimentarios<sup>(171-173)</sup>, ya que ofrece varias ventajas:

1. Es posible analizar miles de péptidos diana simultáneamente, empleando pequeñas cantidades de volumen de suero diluido.
2. El coste del análisis de la muestra biológica individual se ve reducido enormemente.
3. La reproducción de resultados es más exacta, así como el análisis estadístico y la determinación epitópica.

Además de IgE, se pueden analizar simultáneamente otras subclases de inmunoglobulinas (IgG4, IgA e IgG1, por ejemplo), lo que nos permite investigar sobre potenciales respuestas reguladoras que puedan influenciar en la reactividad clínica.



## 10. Medidas terapéuticas en alergia a marisco

En el momento actual, el único tratamiento que existe para la alergia a marisco se limita a la eliminación de forma estricta de la dieta del marisco responsable de la reacción, lo que obliga a conocer exactamente qué marisco o mariscos le producen síntomas al paciente. Para ello es preciso conocer los alérgenos implicados en su reacción alérgica, investigar los fenómenos de reactividad cruzada y así poder dar al paciente órdenes claras de evitación, como por ejemplo si es precisa la evitación de otros crustáceos y/o los moluscos<sup>(174)</sup>. Además, la reactividad cruzada es un fenómeno complejo y de gran variabilidad interindividual. No sólo puede ocurrir con otros mariscos, sino que incluso se han descrito reacciones en personas alérgicas a marisco tras ingestión de preparados alimenticios suministrados como “estimulantes del sistema inmune” o incluso tras contacto con uñas acrílicas<sup>(175)</sup>.

Por otra parte, el paciente debe estar entrenado en el tratamiento de la forma aguda de la reacción alérgica, para revertir posibles reacciones ante el contacto accidental. Es imprescindible que el paciente alérgico a marisco lleve consigo adrenalina autoinyectable para el tratamiento urgente de una anafilaxia, que ha de saber identificar incluso en su fase más incipiente, así como reconocer los síntomas leves que deben ser tratados únicamente con antihistamínicos<sup>(176)</sup>. En ciertas ocasiones además, los pacientes precisan más de una inyección de adrenalina por presentar repetidas reacciones, o una misma reacción con carácter bifásico<sup>(177)</sup>. De hecho, hay estudios que confirman que hasta el 17% de los pacientes que han sufrido una reacción alérgica por alimentos han precisado más de una inyección de adrenalina, y de estos alimentos implicados el más frecuente había sido el marisco<sup>(178)</sup>.

Dado el riesgo potencial de sufrir una reacción grave por una ingestión accidental de marisco, así como la dificultad en ocasiones de interpretar el etiquetado de los alimentos<sup>(179)</sup>, es prioritario investigar sobre un tratamiento activo más eficaz que el mero acto terapéutico de eliminar el alimento de la dieta<sup>(180)</sup>.

## 11. Futuro de la alergia a alimentos

En los últimos años diversos grupos de trabajo han iniciado nuevos métodos terapéuticos frente a la alergia a alimentos mediada por IgE. El tratamiento con inmunomoduladores como el Omalizumab consigue disminuir la dosis umbral necesaria del alimento para desencadenar una reacción alérgica<sup>(181)</sup>. La utilización de un fármaco basado en una formulación de hierbas chinas, FAHF-2, ha obtenido resultados esperanzadores en un modelo murino de anafilaxia inducida por cacahuete<sup>(182)</sup>, que se encuentra en el momento actual en ensayo clínico en fase II, obteniendo excelentes resultados de seguridad y tolerabilidad, y previniendo las reacciones ante contacto accidental en pacientes con alergia a múltiples alimentos<sup>(183)</sup>.

La introducción en la dieta del alimento sometido a altas temperaturas representa también una opción para conseguir un efecto inmunomodulador en algunos pacientes<sup>(176,184)</sup>. De reciente aparición, sin resultados concluyentes pero con interés creciente, está el uso de probióticos, aunque su mecanismo de acción y eficacia es muy controvertido<sup>(185,186)</sup>.

Una de las alternativas terapéuticas más estudiadas y esperanzadoras actualmente es la inmunoterapia oral con alimentos, que consiste en la administración gradual del alimento hasta alcanzar una dosis baja, que permita proteger al paciente de ingestiones accidentales, o hasta alcanzar dosis equivalentes a una ración del alimento, que permite al paciente realizar una dieta libre del alimento. En cualquiera de los dos casos, el objetivo es alcanzar la tolerancia al alimento administrado, ya sea por un mecanismo de inducción de tolerancia, en el que la tolerancia se alcanza de forma permanente e induce cambios inmunológicos a nivel de células T reguladoras, o por un mecanismo de desensibilización, en el que es imprescindible mantener una ingestión regular del alérgeno para mantener el efecto protector<sup>(176)</sup>. Se han realizado también estudios con inmunoterapia epicutánea y

sublingual, pero los resultados clínicos obtenidos en eficacia y seguridad han sido poco esperanzadores<sup>(187-189)</sup>.

En pacientes de alto riesgo y anafilácticos, se han aplicado incluso tratamientos combinados de varios procesos terapéuticos, como por ejemplo inmunoterapia y omalizumab, o inmunoterapia e IFN- $\gamma$ <sup>(190)</sup>.

Sin embargo, todas estas medidas terapéuticas anteriormente citadas se han utilizado únicamente en alimentos como leche, huevo o cacahuete. Ninguna de ellas se ha realizado en marisco, dado el limitado conocimiento que tenemos todavía del curso de la enfermedad, de las características inmunológicas de los alérgenos responsables y su relevancia clínica en estos pacientes.



# **OBJETIVO DEL ESTUDIO**



El objetivo global del estudio es el conocimiento de las características de los pacientes alérgicos a gamba y de los alérgenos responsables. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos primarios:

- 1.- Determinar las características clínicas e inmunológicas de los pacientes alérgicos a gamba.
- 2.- Desarrollar el mapeo epitópico de los cuatro alérgenos más importantes de la gamba.
- 3.- Determinar las diferencias de las características clínicas e inmunológicas entre los pacientes alérgicos a gamba y los pacientes sensibilizados, con clínica sugestiva y tolerantes a gamba.

Objetivos secundarios:

- 1.- Definir la rentabilidad diagnóstica de la IgE sérica específica a extracto completo, a alérgenos purificados y a epítomos de proteínas en el estudio de alergia a gamba.
- 2.- Determinar las diferencias de las características clínicas e inmunológicas entre los pacientes pediátricos y los adultos alérgicos a gamba.
- 3.- Describir las características clínicas e inmunológicas de una muestra de población con síntomas tras la ingestión de gamba.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. Diseño del estudio**

Este estudio prospectivo, transversal, observacional, abierto y no aleatorizado se realizó en cuatro fases:

- a) Para el estudio de las características clínicas e inmunológicas de pacientes alérgicos a gamba se reclutaron pacientes que referían síntomas tras la ingestión de gamba y que acudieron de forma correlativa a la consulta del Servicio de Alergia de la Fundación Jiménez Díaz desde septiembre de 2007 hasta marzo de 2008 y desde marzo hasta junio de 2008 a la consulta de Alergia Pediátrica del Hospital Niño Jesús.
- b) Para el estudio de reactividad cruzada se seleccionaron pacientes que padecían síntomas respiratorios tras la exposición a ácaros y que afirmaban no padecer síntomas tras el consumo de gamba.
- c) Para el estudio inmunológico de reactividad cruzada se utilizaron sueros de pacientes alérgicos a gamba y a ácaros y se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz.
- d) Para el estudio inmunológico de los alérgenos de gamba y su mapeo epitópico se utilizaron sueros de pacientes alérgicos a gamba y se realizó en el Jaffe Food Institute del Mount Sinai, New York (USA).

## 2. Selección de los pacientes

### 2.1. Pacientes con historia de reacción alérgica a gamba

#### 2.1.1. Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 2 años que cumplieran todos los siguientes criterios:

- Acudían en primera consulta o en revisión sucesiva al Servicio de Alergia.
- Referían síntomas compatibles con alergia mediada por IgE tras exposición a gamba (ingestión, contacto y/o inhalación).
- Realizaban dieta exenta de gamba en el momento de la consulta.

#### 2.1.2. Criterios de exclusión

- Tolerancia oral a gamba en el momento de la primera consulta.
- Enfermedad o condición que contraindique la realización de provocación oral con alimentos y/o administración de adrenalina, a excepción de aquellos que habían presentado recientemente anafilaxia tras ingestión de gamba, ya que éstos no iban a ser sometidos a prueba de provocación.
- Intolerancia a lactosa y/o alergia a alguno de los ingredientes del producto con el que se realizó la provocación oral, a excepción de aquellos que habían presentado recientemente alergia anafiláctica a gamba ya que no iban a ser sometidos a la prueba de provocación.
- Negativa a participar en el proyecto.
- Rechazo a la firma del consentimiento informado por parte de los pacientes y/o tutores legales en caso de pacientes menores de 12 años.

## 2.2. Pacientes alérgicos a ácaros sin historia de reacción alérgica a gamba

### 2.2.1. Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 2 años que cumplieran todos los siguientes criterios:

- Acudían en primera consulta o en revisión sucesiva al Servicio de Alergia.
- Nunca habían presentado reacción alérgica a gamba.
- Toleraban la ingestión de gamba en el momento de la inclusión.
- Presentaban sensibilización a ácaro/s, comprobada mediante prueba cutánea positiva a extracto completo de ácaro/s (Alk-Abelló, Madrid, España) (pápula  $\geq 3$  mm superior al control negativo) y/o IgE específica  $>0,35$  kU/l a extracto completo de ácaro/s (Phadia –en el momento actual ThermoFisher-, Uppsala, Suecia).

### 2.2.2. Criterios de exclusión

- Enfermedad o condición que contraindique la realización de provocación oral con alimentos y/o administración de adrenalina, a excepción de aquellos que habían presentado recientemente anafilaxia tras ingestión de gamba ya que no iban a ser sometidos a la prueba de provocación.
- Intolerancia a lactosa y/o alergia a alguno de los ingredientes del producto con el que se realizó la provocación oral, a excepción de aquellos que padecían alergia anafiláctica a gamba ya que no iban a ser sometidos a la prueba de provocación.
- Negativa a participar en el proyecto.
- Rechazo a la firma del consentimiento informado de los pacientes y/o tutores si el sujeto era menor de 12 años.

### **3. Características de la población**

#### *Encuesta demográfica*

En la primera consulta, se informó a todos los sujetos sobre el estudio de forma oral y escrita y se les pidió que firmasen el consentimiento informado. A todos ellos, tanto los que referían síntomas con gamba como los pacientes alérgicos a ácaros, se les solicitó que rellenasen un cuestionario en el que se solicitaba información demográfica (lugar de procedencia, lugar de residencia, edad, profesión, sexo) y la percepción subjetiva sobre síntomas relacionados con ácaros, mariscos y otros alérgenos en los que la tropomiosina estaba implicada (anisakis, cucaracha, mosquito). Además, se interrogó sobre la vía de exposición a marisco (ingestión, inhalación, contacto cutáneo), la forma de cocción del marisco, los síntomas percibidos y el tiempo de latencia desde el contacto con el alérgeno hasta el comienzo de aparición de los síntomas. Se recogieron además datos sobre alergia a otros alérgenos alimentarios o inhalantes.

La encuesta se muestra en la Figura 5.

1. Indique el país y la ciudad en la que nació
2. Indique el país y la ciudad en la que vive
3. ¿Vive habitualmente en la ciudad o en el campo?
4. ¿Ha tenido a lo largo de su vida contacto con el medio rural?
5. Indique su edad, profesión y sexo
6. ¿Ha tenido síntomas tras el consumo de pescado, boquerones en vinagre, sushi, ceviche u otras formas de pescado crudo?
  - a. Sí
  - b. No (Pase a la pregunta 10)
7. Si ha respondido que sí, ¿Qué tipo de malestar ha notado?
  - a. Estornudos, picor de ojos, lagrimeo, mucosidad, y/o picor nasal
  - b. Tos, dificultad para respirar, y/o ruidos en el pecho
  - c. Picor en la piel, aparición de ronchas por el cuerpo
  - d. Hinchazón de labios, párpados y/o cara
  - e. Dolor de estómago, náuseas/vómitos, diarrea
  - f. Sudoración, sensación de ahogo y/o mareo con sensación de desvanecimiento
8. ¿Cuánto tiempo ha pasado desde que comió el pescado hasta que comenzó a encontrarse mal?
9. ¿En qué fecha ocurrió?(Hace cuánto tiempo)
10. ¿Ha tenido estornudos, picor de ojos, lagrimeo, mocos, tos o dificultad para respirar al remover polvo, barrer con una escoba, entrar en casas viejas, estar en contacto con libros o muebles antiguos?
  - a. Sí
  - b. No (Continúe en la pregunta 12)
11. ¿Cuál de esos síntomas ha notado?
12. ¿Se ha encontrado mal tras el consumo de mariscos, como por ejemplo gamba, cangrejo, langosta, caracol, ostra, almeja, mejillón, vieira, langostino, berberecho, calamar, pulpo o sepia?
  - a. Sí
  - b. No (Pase a la pregunta 17)
13. Indique el marisco con el que ha presentado síntomas y el tipo de cocción (crudo/plancha/cocido)
14. ¿Qué tipo de malestar ha notado?
  - a. Estornudos, picor de ojos, lagrimeo, mucosidad, y/o picor nasal
  - b. Tos, dificultad para respirar, y/o ruidos en el pecho
  - c. Picor en la piel, aparición de ronchas por el cuerpo
  - d. Hinchazón de labios, párpados y/o cara
  - e. Dolor de estómago, náuseas/vómitos, diarrea
  - f. Sudoración, sensación de ahogo y/o mareo con sensación de desvanecimiento
15. ¿Cuánto tiempo ha pasado desde que comió el marisco hasta que comenzó a encontrarse mal?
16. ¿En qué fecha ocurrió? (Hace cuánto tiempo)
17. ¿Ha tenido estornudos, picor de ojos, lagrimeo, mocos, tos o dificultad para respirar tras estar en lugares donde haya visto cucarachas?
  - a. Sí
  - b. No (Continúe en la pregunta 19)
18. ¿Cuál de esos síntomas ha notado?
19. ¿Se ha encontrado mal tras sufrir una picadura de mosquito?
  - a. Sí
  - b. No (Pase a la pregunta 23)
20. ¿Qué tipo de malestar ha notado?
  - a. Estornudos, picor de ojos, lagrimeo, mucosidad, y/o picor nasal
  - b. Tos, dificultad para respirar, y/o ruidos en el pecho
  - c. Picor en la piel, aparición de ronchas por el cuerpo
  - d. Hinchazón de labios, párpados y/o cara
  - e. Dolor de estómago, náuseas/vómitos, diarrea
  - f. Sudoración, sensación de ahogo y/o mareo con sensación de desvanecimiento
21. ¿Cuánto tiempo ha pasado desde que sufrió la picadura hasta que comenzó a encontrarse mal?
22. ¿En qué fecha ocurrió?(Hace cuánto tiempo)
23. ¿En algún momento de su vida ha tenido contacto con caballos?
24. ¿Ha tenido en alguna ocasión un acuario con peces del que se ha hecho cargo usted mismo, alimentando los peces y limpiando el acuario?

Figura 5. Cuestionario demográfico y descriptivo.

## 4. Estudio in vivo

### 4.1. Prueba cutánea con la técnica prick-prick

Se realizaron pruebas cutáneas en todos los pacientes que referían síntomas con gamba, en técnica prick-prick con gamba (*Solenocera melanthero*), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), almeja (*Tapes decussatus*), sepia (*Sepia officinalis*), calamar (*Loligo vulgaris*), pulpo (*Octopus vulgaris*), berberecho (*Berberiscus linguatarius*), vieira (*Pecten jacobaeus*) y caracol (*Helix pomatia*), obtenidos de un supermercado local. Las pruebas se realizaron por duplicado, en ambos antebrazos del paciente, según las indicaciones de las guías europeas<sup>(191)</sup>. Se consideró un resultado positivo la aparición de una pápula  $\geq 3$  mm que el control negativo.

### 4.2. Pruebas cutáneas con extractos comerciales

Las pruebas cutáneas en prick se realizaron en la cara anterior del antebrazo, con extractos comerciales de cucaracha (*Blattella germanica*), mosquito (*Aedes communis*) y anisakis (*Anisakis simplex*) (Alk-Abelló, Madrid, España). Para las pruebas cutáneas con extracto comercial a ácaros se eligieron los dos ácaros más frecuentes en la zona central de España, el *Dermatophagoides pteronyssinus* y el *Dermatophagoides farinae* (Alk-Abelló, Madrid, España). Como control negativo se utilizó suero salino fisiológico y como control positivo histamina (10 mg/ml) (Alk-Abelló, Madrid, España). Se consideró un resultado positivo la aparición de una pápula  $\geq 3$  mm que el control negativo, tras la lectura de las pruebas a los 15 minutos, siguiendo las recomendaciones internacionales<sup>(191)</sup>.

### 4.3. Provocación oral doble ciego controlada con placebo (PODCCP) con gamba

La prueba de provocación con gamba se realizó a cada paciente en doble ciego, durante dos días consecutivos en los que se administraron el preparado activo



y el placebo en orden aleatorio y supervisado por uno de los técnicos del laboratorio. Aquellos pacientes que habían padecido una reacción anafiláctica tras la ingestión de gamba no fueron sometidos a provocación, según recomendaciones de las guías internacionales<sup>(153,192,193)</sup>, pero fueron incluidos en el estudio.

El método de enmascaramiento se basó en una receta publicada anteriormente y que se modificó para optimizar el método consiguiendo enmascarar además el sabor y la consistencia<sup>(194)</sup>. Consistió en la administración de dosis crecientes de un batido preparado con 250 g de helado de vainilla y chocolate, media cucharada de aroma de vainilla y dos cucharadas de cacao. El alimento se sirvió frío, y al preparado activo se le añadieron 24 g de gambas, equivalente a una ración de 12 gambas (*Solenocera melanthera*, una de las especies más consumidas en España), cocidas y batidas. Cinco investigadores recibieron en ciego, tanto el material activo como el placebo, no siendo capaces de distinguir cuál de ellos contenía las gambas, confirmando que la preparación estaba enmascarada de forma adecuada.

Pacientes intolerantes a la lactosa o alérgicos a alguno de los componentes del preparado fueron excluidos del estudio, por falsa positividad del resultado de la provocación.

La prueba se consideró positiva en caso de presentar uno o más de los siguientes síntomas en las 4 horas siguientes a la realización de la prueba: náuseas y/o prurito oral o síndrome de alergia oral (SAO) tras al menos dos tomas, dolor abdominal, vómitos, urticaria, angioedema, rash eritematoso pruriginoso, rinitis, conjuntivitis, broncoespasmo, edema laríngeo, tos, sibilancias, hipotensión y/o shock. Se consideró un resultado negativo la ausencia de síntomas durante las 4 horas siguientes tras ingerir 24 g de gamba. Los pacientes que no refirieron síntomas en la PODCCP, recibieron nuevamente 24 g de gamba en una provocación abierta. Los pacientes con ausencia de síntomas tras la ingestión de 24 g tanto en la PODCCP como en la provocación abierta constituyeron el grupo de pacientes tolerantes a gamba.

Todas las provocaciones se realizaron en el laboratorio del Servicio de Alergia, en medio hospitalario, con medicación y soporte cardiopulmonar avanzado

disponible para el tratamiento de una eventual reacción, y bajo la supervisión de enfermería, de la investigadora y de un médico especialista en Alergología.

La prueba de provocación determinó el diagnóstico definitivo de alergia a gamba, puesto que confirma o descarta "la expresividad clínica" de la sensibilización a gamba.

#### 4.4. Asignación de grupos para el análisis de los resultados

Los pacientes incluidos en el estudio fueron asignados a uno de los siguientes grupos:

A) Alérgicos a gamba: pacientes sensibilizados a gamba, que referían síntomas tras la ingestión de gamba y presentaban una PODCCP positiva

B) Tolerantes a gamba: pacientes sensibilizados a gamba, que referían síntomas tras la ingestión de gamba y tuvieron resultados negativos en la PODCCP y provocación oral abierta.

C) Alérgicos a ácaros: pacientes diagnosticados de alergia a ácaros que toleraban el consumo de gamba.

Para el análisis de población pediátrica y población adulta de los pacientes alérgicos a gamba, se consideró como grupo pediátrico (P) los pacientes entre 0 y 18 años y grupo adulto (M) los mayores de 18 años.

#### 4.5. Análisis de los datos clínicos

Las características de los pacientes se analizaron utilizando métodos estadísticos descriptivos. La prueba de normalidad se realizó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones de valores de medias entre grupos se realizaron utilizando el test de Wilcoxon, de Kruskal-Wallis, de Mann-Whitney y ANOVA. El t test no pareado con corrección de Welch o t test para datos no paramétricos y paramétricos, respectivamente.

Las variables cualitativas se han descrito mediante el número y el porcentaje de pacientes y se han comparado mediante la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Las variables cuantitativas (IgE específicas) se han descrito mediante la mediana y los cuartiles, y se han comparado mediante la prueba de Mann-Whitney.

Las asociaciones se analizaron mediante la correlación de Pearson, chi-cuadrado y ANOVA se utilizaron para variables categóricas y continuas, respectivamente. Se consideraron diferencias significativas cuando la  $p \leq 0,05$ .

Se realizaron además curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor), representando de forma gráfica la sensibilidad frente a (1 – especificidad), y en las que se mostraron:

- El área bajo la curva que es una medida de la capacidad que tiene la IgE específica para predecir una provocación positiva. En general a partir de un área de 0.8 se considera que la capacidad predictiva es buena y si supera 0.9 hablamos de una capacidad muy buena.
- El punto de corte que maximiza simultáneamente los valores de sensibilidad y especificidad. Este punto marcado en la curva ROC es el valor de la IgE específica para el cual se maximiza la suma de sensibilidad y especificidad. Si agrupamos los valores de la IgE según este valor de forma que distingamos entre valores iguales o inferiores y valores superiores obtendremos unos valores concretos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.
- La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo que se obtiene con el punto de corte indicado.

## 5. Estudio in vitro

Para la realización de las pruebas in vitro, se realizó una extracción de sangre a cada paciente, que se centrifugó para obtener el suero y se almacenó a -80°C. En pacientes mayores de 12 años y adultos, se procedió a la extracción de 10 ml de sangre, en niños entre 7 y 12 años se obtuvieron 7 ml, y en niños menores de 7 años la sangre obtenida para centrifugación fueron 5 ml.

### 5.1. Determinación de IgE sérica total y específica

Se determinó la IgE total en todos los pacientes del estudio, mediante inmunoquimioluminiscencia.

Las determinaciones de IgE específica se realizaron frente al extracto comercial de gamba, tropomiosina recombinante de gamba (rPen a 1), *anisakis*, *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Blatella germanica*, *aedes communis*, cangrejo de mar, cangrejo de río, mejillón, calamar, pulpo, almeja, ostra, langosta, caracol y vieira se realizaron mediante fluoroinmunoensayo por el sistema CAP (Phadia, Uppsala, Suecia). Se consideraron positivos valores de IgE específica  $\geq 0,35$  kU/L.

### 5.2. Preparación de extractos

El extracto de gamba cruda se preparó a partir de la cola muscular de la gamba blanca (*Litopenaeus vannamei*). La cola de la gamba cruda fue pelada completamente y homogeneizada en un mortero hasta obtener una pasta blanda. La proteína fue extraída mediante agitación en PBS con un inhibidor de la proteasa (Roche, Indianapolis, Ind). Se añadió NaN<sub>2</sub> (1:400) en agua destilada (20% peso/volumen) como conservante y se incubó durante toda la noche a 48°C. Se centrifugó la mezcla a 3000 rpm durante 10 minutos a 48°C y posteriormente a 15000 rpm durante 5 minutos a 48°C.

El extracto de gamba cocida se preparó mediante la cocción de la cola muscular de gamba, pelada, en agua destilada durante 5 minutos, y homogeneizada siguiendo el mismo protocolo anteriormente citado.

La concentración proteica se cuantificó mediante espectrofotometría con el *Coomassie Plus Protein Assay* (Pierce, Rockford, Ill)<sup>(80)</sup>. Se utilizaron extractos con una concentración de 1,6 mg/ml para gamba cocida y 20 mg/ml para gamba cruda.

El extracto de ácaro utilizado fue *D.pteronyssinus*, suministrado por Laboratorios Leti S.L., (Madrid, España). La concentración de proteína que contenía el extracto se estimó según el método Bradford<sup>(195)</sup> y utilizando como estándar albúmina sérica bovina. En cuanto al extracto utilizado para el estudio de las distintas tropomiosinas, se utilizó la proteína natural purificada de *Penaeus monodon* (nPen m 1) y la tropomiosina recombinante del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (rDer p 10), ambas adquiridas de Bial-Aristegui (Bilbao, España).

Los extractos se almacenaron a -20°C, hasta que fueron utilizados.

### 5.3. Electroforesis unidimensional e inmunotransferencia con gamba cruda y cocida

Se prepararon extractos de la gamba blanca del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), tanto cruda como cocida. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (Nupage 4-12% Zoom Gels; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se transfirieron a una membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) para la detección de bandas ligadoras de IgE. Las membranas se incubaron con suero de pacientes alérgicos a gamba (con diluciones de 1:5 a 1:20 en PBS-Tween [1% BSA y 10% suero de cabra]) durante una hora. Como anticuerpo secundario se utilizó IgE anti-humana de cabra marcada con Iodo 125 (DiaMed, Windham, ME, USA). Tras el aclarado con PBS, las membranas se revelaron tras exposición durante 10 días a Kodak Imaging Film (Carestream Health Inc, Rochester, NY, USA). Como control negativo se utilizó un sujeto no atópico.

#### 5.4. Electroforesis unidimensional e inmunotransferencia con D. pteronyssinus, nPen m 1 y rDer p 10

Las proteínas del extracto de D. pteronyssinus, nPen m 1 y rDer p 10 fueron separadas de la forma siguiente<sup>(196)</sup>:

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y siguiendo el método de Laemmli<sup>(197)</sup>. Los extractos alergénicos se disolvieron en una muestra buffer (0,05 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 8% b-mercaptoetanol y 0,1% azul bromofenol) y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos. Los extractos se cargaron a 40 mg por carril. Las proteínas son separadas por electroforesis por peso molecular. Las bandas proteicas se detectaron con Coomassie coloidal. Para los ensayos de inmunodetección, las bandas proteicas separadas fueron transferidas electroforéticamente en una membrana de nitrocelulosa de 0,45 mm (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) y la membrana fue bloqueada con gelatina 0,25% en NET (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl, 0,05 M EDTA, 0,5% X-100 Triton).

Para la detección inmunológica de proteínas ligadoras de IgE, las proteínas individuales se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) y se incubaron a 4°C durante 18 horas con una dilución 1:3 de suero. Los anticuerpos unidos a la IgE se detectaron mediante la utilización de anti-IgE humana de conejo conjugada con peroxidasa (DakoCytomation, Dinamarca) y utilizando el método de quimiluminiscencia como recomienda el fabricante (Amersham Biosciencias, Reino Unido). Como controles negativos, se utilizó el suero de un sujeto no atópico.

#### 5.5. Análisis peptídico mediante micromatriz

Un experimento peptídico por microarray o micromatriz comprende dos pasos fundamentales:

- a) la impresión de los péptidos en un sustrato epóxido (una placa de cristal, de aquí en adelante) en la que los péptidos se unen covalentemente a los grupos epóxido de la superficie de la placa;
- b) etiquetado inmunológico de las placas con el suero de los pacientes

El método utilizado fue el descrito por Lin y cols<sup>(198)</sup>.

#### 5.5.1. *Sintetización peptídica y sus condiciones de impresión*

Se obtuvo la secuencia primaria de péptidos de los 4 alérgenos principales de la gamba: *Litopenaeus vannamei* Lit v 1 (tropomiosina), Lit v 2 (AK), Lit v 3 (MLC) y Lit v 4 (SCP). Esta secuencia peptídica, ya conocida y descrita<sup>(80,93-95)</sup> es sintetizada mediante la técnica PepStar y comercializada por JPT Peptide Technologies (Berlín, Alemania) a una concentración de 2mM. Cada péptido está formado por 15 aminoácidos, y se solapa con el péptido adyacente en 3 aminoácidos.

Una vez recibidos los péptidos, se diluyeron (1:2) con tampón de impresión de proteínas PPB (Protein Printing Buffer) (ArrayIt Corp, Sunnyvale, California) y se almacenaron a -80°C en una placa de ensayo de 384 pocillos, en una superficie de poliestireno blanco y con fondo redondeado, con bajo volumen (Corning Incorporated, Corning, NY) cubierto con Robolid (Corning Incorporated) en un recipiente de plástico sellado.

Posteriormente, todas las muestras de péptidos se imprimieron en placas de cristales cuya superficie contenía derivado epoxy (SuperEpoxy Substrate, ArrayIt Corp) en grupos de dobletes contiguos. Los dominios epoxy favorecen la unión con los grupos amino de los péptidos. Para la impresión se utilizó NanoPrint Microarrayer 60 (ArrayIt Corp) equipado con 2x4 ArrayIt Stealth Micro Spotting Pin (SMP3B). El resultado a analizar se obtendrá en forma de puntos que corresponderán a cada péptido, y adquirirán diferente color según la intensidad de la unión a IgE. Como control negativo, en un doblete se incluyó sólo Protein Printing Buffer, para normalizar el ruido de fondo, y como control positivo albúmina sérica bovina (BSA)

marcada con fluorocromo (GC-BSA) y que se utilizó como referencia para alinear la cuadrícula de puntos resultante, es decir, para controlar el posicionamiento de los péptidos en el biochip. Tras la impresión, las placas de cristal se secaron a temperatura ambiente durante una noche.

#### 5.5.2. *Etiquetado*

Se delimitó el área alrededor de cada placa con un bolígrafo hidrofóbico (DakoCytomation Pen, DAKO, Glostrup, Dinamarca), para impedir la mezcla de cada muestra entre sí.

Al día siguiente, las placas de cristal se bloquearon con 400 µl de albúmina sérica humana (HSA) diluida a 1% en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBS-T), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la solución de PBS-T/HSA de la superficie del cristal mediante aspiración y se incubaron con 50 µl de suero de paciente, diluido 1:5 en PBS-T/HSA durante 24 horas a 4°C. Entonces, se lavaron las placas con PBS-T 0.05% y se incubaron durante otras 24 horas a 4°C con una mezcla de 3 anticuerpos monoclonales de anti-IgE humana, biotinilados, procedentes de tres empresas diferentes: uno de Invitrogen (Carlsbad, California) diluido 1:250, otro procedente de BD Biosciences PharMingen (San Jose, California) diluido 1:250 y por último un tercer anticuerpo de Phadia (Uppsala, Suecia), diluido 1:1000 en PBS-T/HSA. Posteriormente, las placas de cristal se equilibraban con tampón de dendrímero (Genisphere. Philadelphia, USA) y se incubaron durante 3 horas a 31°C con Dendrimer Anti-Biotina Oyster 550 (350; Genisphere, Hatfield, Pa) y diluido en tampón de dendrímero 0,6 µg/mL y se añadieron 0,02 µg/mL de ADN de esperma de salmón (Invitrogen).

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una caja transparente preservando las condiciones óptimas de humedad (Binding Site, Birmingham, UK) y en agitación mediante una plataforma rotatoria.

En la Figura 6 se muestran las imágenes de preparación de las placas de microarray: impresión e incubación para el etiquetado.



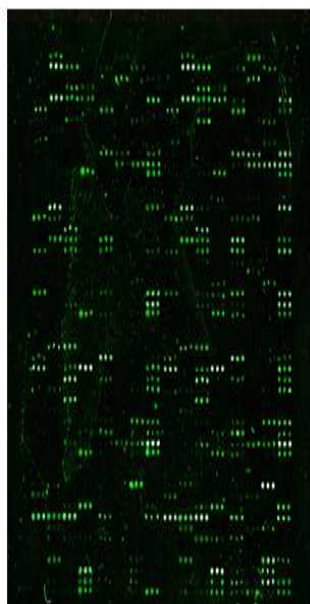


**Figura 6.** Preparación de las placas de microarray. En la fotografía superior se muestra la imagen de impresión de los aminoácidos en las placas, y en la fotografía inferior el proceso de incubación para el etiquetado.

A continuación, se realizaron sucesivos lavados con PBS-T, 15 mmol/L Tris, PBS 0,1X y PBS 0,05X con lo que se optimizó la intensidad de la señal recibida. Las placas de cristal se secaron mediante centrifugación y fueron escaneadas con ScanArray Gx (PerkinElmer, Waltham, Mass). Las imágenes se archivaron en formato TIF. Con un software creado específicamente para esta técnica, se determinó la señal fluorescente respecto al alérgeno y respecto al lugar que se encuentra en cada espacio de reacción.

Para los ensayos de inhibición, se utilizaron extractos de gamba cruda y cocida como inhibidores y se realizaron a una mezcla de sueros de 5 pacientes con provocación oral positiva. La mezcla de sueros fue diluida 1/5 y preincubada durante una hora a temperatura ambiente con extracto de gamba cruda o cocida, o extracto de guisante como control, todos ellos a una concentración final de inhibidor de 0,5 mg/mL. Posteriormente, el resultante de la mezcla de sueros con el inhibidor fue incubado y procesado según se ha descrito anteriormente.

En la Figura 7 se muestra la señal fluorescente emitida por los aminoácidos detectores de IgE y obtenida tras análisis por microarray.



**Figura 7.** Imagen que muestra la señal fluorescente de microarray digitalizada. Cada uno de los puntos verdes (dots) corresponde a un aminoácido detector de IgE.

### 5.5.3. *Análisis de los datos*

Siguiendo la experiencia adquirida de estudios previos<sup>(198)</sup>, la señal fluorescente de cada punto fue digitalizada mediante el programa ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA), y exportadas como archivos de texto delimitados por comas. Los datos fueron analizados utilizando un análisis simple en los que el valor crudo fluorescente (expresado en unidades digitales de fluorescencia, DFUs) para cada punto fue calculado mediante la fluorescencia media del punto al que se le substrajo la fluorescencia de fondo que obtenía la imagen. El análisis más complejo, para las placas de cristal etiquetadas, se transformó a z scores. Se consideró como epítipo ligador de IgE a 2 ó más péptidos superpuestos<sup>(199)</sup>, por lo que se efectuó el consecuente análisis mediante el ajuste de cada z score a la mediana de sí mismo y los 2 péptidos adyacentes (promedio ponderado de z score), mediante la utilización de la fórmula  $z = 0,25 * z_{-1} + 0,5 * z_0 + 0,25 * z_{+1}$

El valor índice z de cada péptido fue obtenido de la mediana de z scores de las 4 repeticiones. Si una muestra de un péptido individual tenía un z score que se excedía en 3 ó 2, se consideró positivo e indicaba que existía señal sobre el fondo con un valor de  $p < 0,003$  ó  $0,05$ , respectivamente.

En la población analizada, se consideró epítipo ligador de IgE si contenía al menos 2 péptidos contiguos con una media ponderada de z score de más de 3 para tropomiosina, para MLC y SCP, o mayor de 2 para AK. El hecho de considerar z score inferior para la identificación epitópica de la AK se debe a la menor intensidad de unión de los péptidos de AK.

Para calcular las diferencias estadísticas entre media ponderada de z scores de pacientes con provocación positiva, negativa, controles negativos y entre niños y adultos se utilizó el test de Wilcoxon y valores Q (calculados por el proyecto R)<sup>(200)</sup>, que tratan de resolver el problema del análisis múltiple.

Cuando establecemos un umbral para el valor p estadístico, por ejemplo,  $0,05$ , quiere decir que existe un 5% de probabilidades de que el resultado sea un falso positivo. Sin embargo, este 5% es aceptable si lo que realizamos es un único

análisis, pero si debemos realizar muchos análisis de los datos, entonces ese 5% puede resultar en un gran número de falsos positivos. Esto es lo que se conoce como el problema del análisis múltiple.

Muchos de los métodos tradicionales para resolver los problemas derivados del análisis múltiple consisten en intentar asignar un valor ajustado a  $p$  para cada análisis, o reducir el umbral del valor  $p$ . Pero, de esta forma, además de reducir el número de falsos positivos, reducimos también el número de verdaderos positivos. El “False Discovery Rate” es un método más reciente que, además de determinar valores ajustados de  $p$  para cada test, controla el número de falsos resultados en aquellos análisis que muestran resultados significativos. Estos valores ajustados se conocen como valores  $q$ . Es decir, que si un valor  $p$  de 0,05 implica que el 5% de todos los análisis resultan en falsos positivos, un valor  $q$  (o valor  $p$  ajustado por FDR) de 0,05 implica que el 5% de los análisis significativos resultarán en falsos positivos, lo que supone una cantidad mucho menor. Este método se utiliza ampliamente en proteómica, ya que con estos análisis se obtienen cientos o miles de variables.

Como umbrales significativos, se seleccionaron valores de  $p < 0,01$  y de false discovery rate (FDR) inferior a 0,05. Tanto el FDR como los valores  $q$  fueron utilizados para ajustar las comparaciones múltiples en el análisis peptídico por microarray.

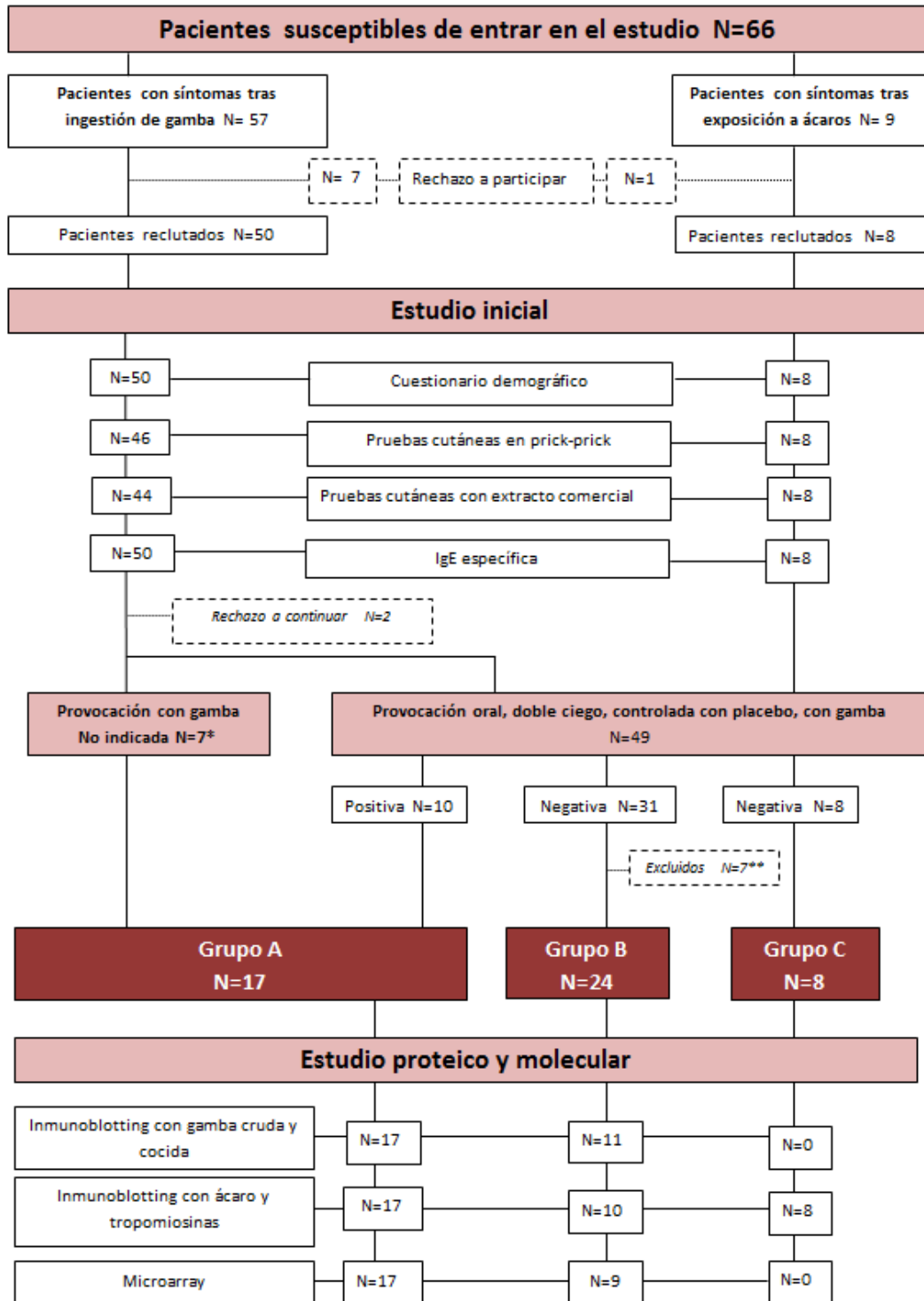
Para conseguir diferencias estadísticamente significativas al comparar grupos de edad, para el análisis por microarray se amplió el tamaño muestral con sueros de pacientes alérgicos a gamba de diversas edades almacenados en el depósito de sueros del propio Mount Sinai Hospital (Nueva York, EEUU). Se trataba de pacientes con IgE específica muy positiva y procedentes de áreas geográficas que comprendían Las Palmas de Gran Canaria y Nueva York.

# RESULTADOS



## 1.- Pacientes incluidos

En la Figura 8 se muestra el diagrama de flujo con el número de pacientes reclutados.



\*Por historia de anafilaxia \*\* Por presentar pruebas in vivo, in vitro y provocación negativa

**Figura 8.** Diagrama de flujo del proyecto

Se seleccionaron un total de 66 pacientes, 57 cumplían criterios de historia compatible con alergia a gamba mediada por IgE según la encuesta, 7 de ellos rechazaron participar en el estudio. Un total de 50 pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión fueron reclutados.

Además, 8 de 9 pacientes alérgicos a ácaros a los que se les propuso participar aceptaron. Todos tenían síntomas respiratorios (rinoconjuntivitis y/o asma) por ácaros y pruebas cutáneas e IgE sérica positivas a *D.pteronyssinus* y/o *D.farinae*. Todos ellos toleraban ingestión de gamba confirmado mediante PODCCP.

## 2.-Características de la población

### 2.1 Características demográficas de la población

#### 2.1.1. *Pacientes con síntomas con gamba*

- Sexo y edad: Se incluyeron 23 varones (46%) y 27 mujeres (54%), de edades comprendidas entre los 2 y los 75 años (mediana 26 años  $\pm 17,44$ ).
- Lugar de residencia habitual: Todos ellos residían en Madrid y vivían habitualmente en medio urbano, aunque 34 (68%) aseguraban haber tenido contacto habitual en algún momento de su vida con el medio rural.
- Lugar de origen: Del total de 50 pacientes alérgicos a gamba, 32 (64%) eran españoles: 25 (50%) eran originarios y nacidos en Madrid, 2 del Cáceres y uno en cada una de las siguientes localidades: Segovia, País País Vasco, Sevilla, Granada y Teruel. De los 18 pacientes restantes, dos procedían de Portugal, uno de Austria, otro de Rumanía, 4 de Sudamérica (República Dominicana, Ecuador, Paraguay y Argentina) y un paciente era originario de Japón.

#### 2.1.2 *Pacientes alérgicos a ácaros*

- Sexo y edad: Se incluyeron 4 varones (50%) y 4 mujeres (50%), de edades comprendidas entre los 15 y los 62 años.



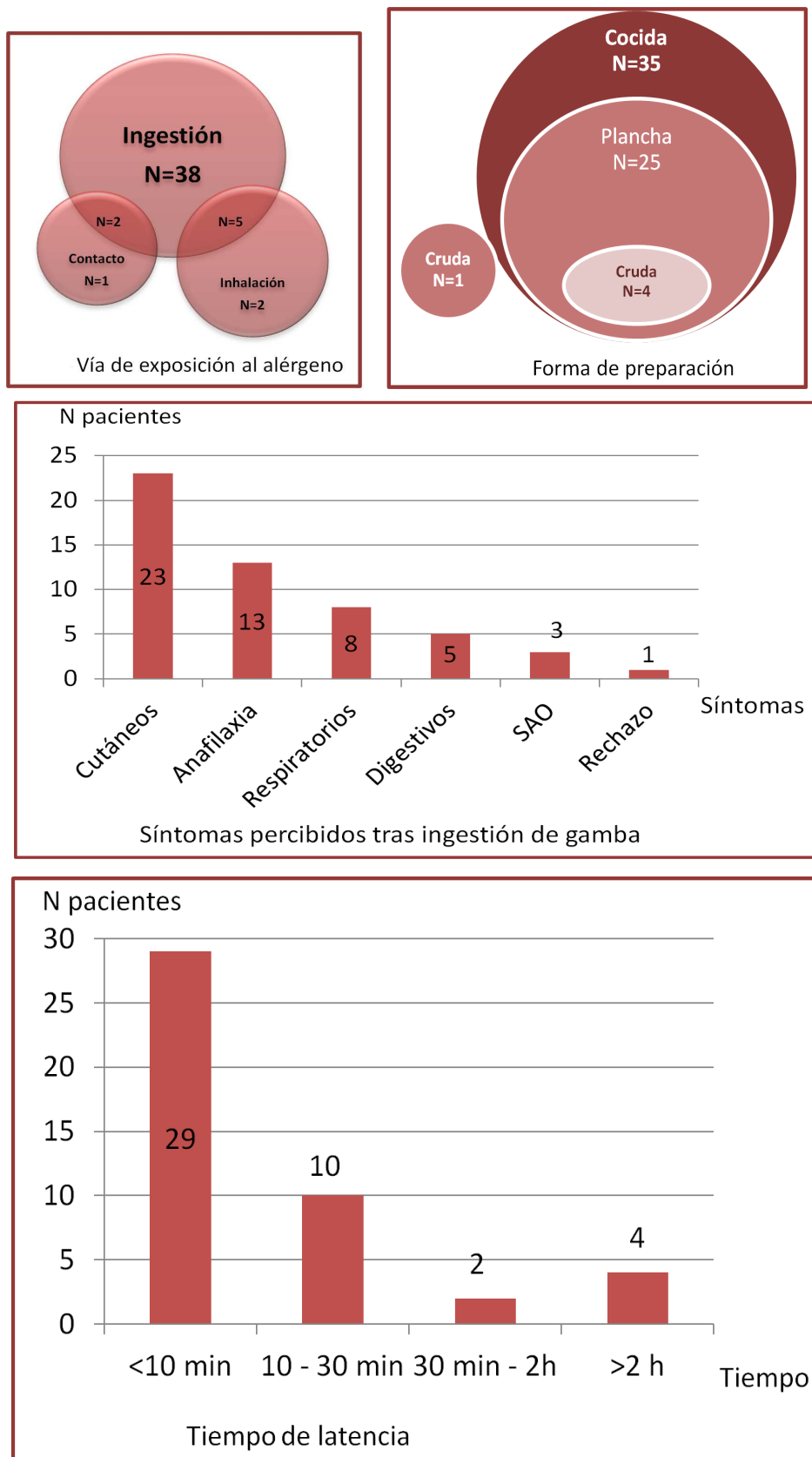
- Lugar de residencia habitual: Todos ellos residían en Madrid y vivían habitualmente en medio urbano, y todos aseguraban haber tenido contacto habitual en algún momento de su vida con el medio rural.
- Lugar de origen: Todos los pacientes seleccionados, alérgicos a ácaros, eran españoles: 3 (37,5%) nacidos en Madrid. Los 5 pacientes restantes procedían de Cáceres, País Vasco, Ávila, Galicia y Zamora.

## 2.2. Características clínicas de los pacientes con síntomas con gamba

### 2.2.1. *Exposición a gamba y clínica alérgica*

Las características de la exposición a gamba se muestran en la Figura 9.

## Resultados



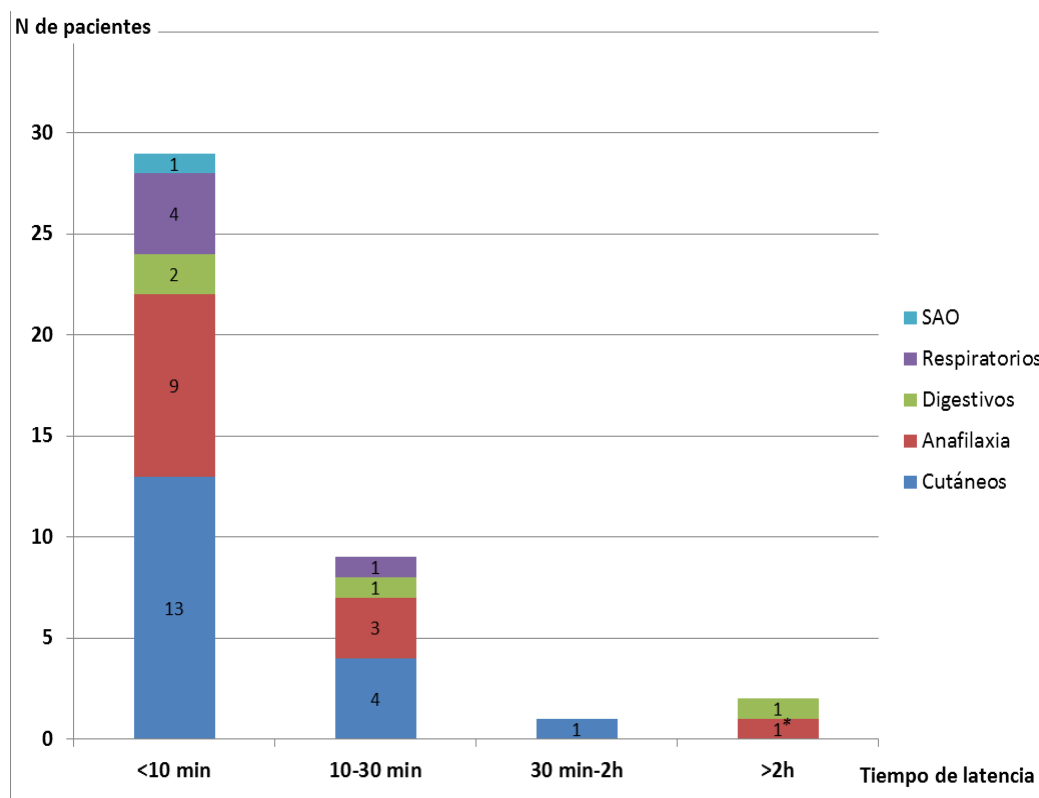
**Figura 9.** Características clínicas de la exposición a gamba en la población estudiada. SAO: Síndrome de alergia oral

- Vía de exposición al alérgeno: 45 de los pacientes (90%) referían síntomas tras ingestión de gamba. En 5 casos (10%) ocurrió además tras la exposición respiratoria mediante inhalación de vapor de cocción de gamba y 2 (4%) padecieron también síntomas tras contacto cutáneo. En dos pacientes (4%), la reacción alérgica ocurrió exclusivamente tras exposición inhalatoria, y en 1 paciente (2%) exclusivamente tras contacto cutáneo. Los 3 pacientes que no referían síntomas tras exposición digestiva, eran niños que no habían ingerido nunca el alimento.
- Forma de preparación: La mayoría de los pacientes [49 (98%)], habían presentado síntomas tras someter la gamba a altas temperaturas (35 con gamba cocida; 25 con gamba a la plancha); 4 de ellos los referían también tras contacto con gamba cruda. Un paciente japonés refería síntomas exclusivamente tras ingestión de gamba cruda, tolerando la gamba cocinada en cualquier forma de preparación.
- Síntomas percibidos: 23 pacientes (46%) presentaron síntomas cutáneos (urticaria, exantema o eritema); 13 pacientes (26%) refirieron anafilaxia. De los 8 (16%) pacientes que referían síntomas respiratorios, 4 (8%) padecieron rinoconjuntivitis y 4 (8%) broncoespasmo; 5 casos (10%) refirieron síntomas digestivos (náuseas/vómitos/dolor abdominal) y 3 (6%) pacientes presentaban síndrome de alergia oral (SAO). Un paciente en edad pediátrica refería rechazo al alimento (2%).
- Tiempo de latencia: El tiempo transcurrido entre el consumo de gamba y el inicio de los síntomas, en la población estudiada (N=50) se muestra en la Tabla II y se expresa mediante el número de pacientes que mostraron síntomas en cada intervalo de tiempo y entre paréntesis el porcentaje de los mismos.

<b>Tabla II. Tiempo de latencia desde la exposición a gamba hasta el inicio de los síntomas</b>	
<b>&lt; 10 min</b>	29 (58%)
<b>10-30 min</b>	10 (20%)
<b>30 min – 2h</b>	2 (4%)
<b>&gt;2h</b>	4 (8%)

- En 4 casos (8%) la reacción ocurrió con un tiempo de latencia superior a 2h tras la ingestión del alimento. En uno de ellos, la paciente refería síntomas de anafilaxia en relación con la ingestión de AINEs. De los 50 pacientes con historia compatible con alergia a gamba 10 (20%) no recordaban el tiempo de latencia entre la ingestión del alimento y la aparición de los síntomas.

Se relacionó el tiempo de latencia con los síntomas percibidos en la reacción, y se observó que los síntomas sistémicos únicamente ocurrían de forma inmediata. El resultado se muestra en la Figura 10.



\*La reacción anafiláctica ocurrida al cabo de más de 2h tras la ingestión de gamba estaba relacionada con la ingestión de AINEs.

**Figura 10.** Relación entre los síntomas percibidos tras exposición a gamba y el tiempo de latencia de su aparición tras el contacto con gamba. SAO: Síndrome de Alergia Oral.

### 2.2.2. Síntomas por exposición a ácaros en el grupo de los pacientes con síntomas por gamba

De los 50 pacientes seleccionados con síntomas tras la ingestión de gamba, 23 (46%) referían también síntomas con exposición a ácaros. En 21 de los 23 casos (91%) los síntomas fueron nasooculares (rinitis, conjuntivitis), en 7 (30.4%) bronquiales (tos, disnea y/o sibilancias) y en un paciente (4.34%) síntomas cutáneos (prurito y eccema).

### *2.2.3. Morbilidad asociada de los pacientes con síntomas con gamba*

Tras analizar los resultados del cuestionario se encontró que 12 (24%) pacientes que referían síntomas con gamba relataban síntomas con otros parásitos y/o insectos filogenéticamente relacionados con la gamba y en los que se había reportado la tropomiosina como alérgeno:

- ✓ En ambientes en los que había cucarachas, presentaron síntomas 7 sujetos (14%), de los cuales 5 referían síntomas respiratorios y 2 síntomas cutáneos.
- ✓ De 7 (14%), pacientes que referían síntomas por alergia a anisakis 4 manifestaban síntomas digestivos, 3 cutáneos, 2 anafilaxia y 1 paciente clínica respiratoria.
- ✓ 2 pacientes (4%) referían urticaria tras picadura de mosquito.

De los 50 pacientes incluidos en el estudio, 30 (60%) habían sido diagnosticados de otra alergia concomitante, cuya frecuencia se muestra en la Tabla III, expresándolo en número de pacientes y entre paréntesis se muestra el porcentaje de éstos.

Tabla III. Morbilidad alérgica asociada a los pacientes que acudían con síntomas tras exposición a gamba (N=50)		
<b>Alimentos</b>	Pescado	8 (16%)
	Frutas	5 (10%)
	Huevo	4 (8%)
	Legumbres	3 (6%)
	Frutos secos	3 (6%)
<b>Inhalantes</b>	Pólenes	16 (32%)
	Epitelios	6 (12%)
	Cucarachas	5 (10%)
	Hongos	2 (4%)
	Ocupacional	1 (2%)
<b>Otros</b>	Dermatitis contacto	1 (2%)
	Medicamentos	1 (2%)

La alergia al alimento más frecuentemente diagnosticado entre los pacientes alérgicos a marisco fue alergia a pescado y, de entre los alérgenos ambientales, la alergia a pólenes.

### 2.3. Características clínicas del grupo de pacientes alérgicos a ácaros.

- Síntomas con gamba: Todos los pacientes alérgicos a ácaros aseguraban una correcta tolerancia a la ingestión de gamba y no referían síntomas por otras vías de exposición.

- Síntomas con ácaros: Los 8 pacientes (100%) estaban diagnosticados de rinococonjuntivitis. Además, 3 de ellos (37,5%) presentaban asma.
- Morbilidad asociada: En cuanto a los síntomas percibidos, un paciente refería síntomas nasooculares en ambientes donde había cucaracha y también, este mismo paciente, urticaria generalizada tras picadura de mosquito.

Al comprobar por historia clínica otras alergias diagnosticadas, se encontró que 6 pacientes (75%) eran alérgicos a pólenes, 4 a epitelios (50%), 1 a cucarachas (12,5%) y otro padecía dermatitis de contacto (12,5%).

### **3.-Estudio in vivo**

#### **3.1. Prueba cutánea a gamba y otros mariscos**

La prueba cutánea a gamba resultó positiva en 35 pacientes que referían síntomas por exposición a gamba de los 46 testados (76%).

La sensibilización a otros mariscos diferentes a gamba, valorada mediante prueba cutánea, osciló entre el 31 y el 52%, obteniendo los siguientes resultados (se muestran resultados de positividad): El marisco al que los pacientes mostraban una mayor tasa de sensibilización fue el calamar (24/46; 52,17%), seguido por almeja (21/46; 45,65%), el pulpo (20/46; 43,47%), vieira (19/44; 43,18%), caracol (17/45; 37,77%), berberecho (17/46; 36,95%) y, por último, el que presentó menor porcentaje de positividad fue el mejillón (14/45; 31,11%).

#### **3.2. Prueba cutánea a otros invertebrados**

El mayor porcentaje de positividad de la prueba cutánea a otros invertebrados en pacientes que referían síntomas tras ingestión de gamba fue para el anisakis con



37,20% (16/43), seguido por los ácaros (16/44, 36,36%), la cucaracha (13/37; 35,13%), y el mosquito (11/42; 26,19%).

### 3.3. Provocación oral, doble ciego (PODCCP) con gamba

La PODCCP se realizó en 41 de los 50 pacientes (82%). En 7 (14%) sujetos, de los cuales 5 de ellos eran adultos, la provocación no estaba indicada por haber presentado recientemente historia de anafilaxia tras ingestión de gamba y fueron considerados alérgicos a gamba. Dos pacientes (4%) se negaron a realizar la provocación y fueron excluidos.

La PODCCP confirmó el diagnóstico de alergia a gamba en 10 pacientes (10/41; 24%), de los cuales 8 eran niños y 2 adultos. Los 31 pacientes que presentaron una provocación negativa (31/41; 75,6%), incluyeron 4 niños y 27 adultos a los que se sometieron, todos ellos, a una provocación abierta, que resultó positiva únicamente en un niño. Por lo tanto se consideraron alérgicos a gamba a 17 pacientes: 10 niños y 7 adultos.

Los síntomas tras la provocación ocurrieron en todos los casos de forma inmediata, excepto en una niña que presentó urticaria 6 horas después de la ingestión. Los valores de IgE específica a gamba y tropomiosina en esta paciente fueron de 96 y 94 kU/L, respectivamente.

En cuanto al grupo de pacientes alérgicos a ácaros, los 8 pacientes (100%) presentaron una PODCCP negativa a gamba.

## 4. Estudio in vitro

### 4.1. Determinación de IgE total y específica a gamba y tropomiosina

Los resultados obtenidos de IgE total de la muestra de suero de los pacientes que referían historia de alergia a gamba osciló entre 7 y 1373 kU/l, con una mediana

de 266,5 kU/l. La IgE específica a gamba mostró un rango (0,84-11,7 kU/l), mediana 2,59 kU/l. En cuanto a la IgE específica a tropomiosina: rango (0,59-9,79 kU/l), mediana 0,43 kU/l.

#### 4.2. Determinación de IgE específica a otros invertebrados

Los resultados obtenidos de IgE específica a otros invertebrados, entre los pacientes alérgicos a gamba, fueron en un mayor porcentaje de pacientes, positivos a ácaros. Se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Valores de IgE específica a invertebrados		
	kU/l Mediana (rango intercuartílico)	Porcentaje de pacientes con resultado >0,35 kU/l
Anisakis	1,32 (0,6-2,88)	53,84
D. pteronyssinus	2 (0,86-9,75)	82,92
D. farinae	2,41 (1,17-9,07)	80,48
Cucaracha	2,28 (1,07-3,46)	70
Mosquito	2,82 (1,29-4,98)	35

#### 4.3. Determinación de IgE específica a otros mariscos

Los resultados de IgE específica a mariscos, de los pacientes que referían síntomas con gamba, mostraron una mayor sensibilización, a los crustáceos, seguido de los cefalópodos y por último una menor sensibilización a los moluscos y bivalvos. Los resultados se muestran, en kU/l, en la tabla V.

Tabla V. Valores de IgE específica a mariscos		
	kU/l Mediana (rango intercuartílico)	Porcentaje de pacientes con resultado >0,35 kU/l
<b>Gamba</b>	2,59 (0,84-11,7)	82,92
<b>Tropomiosina</b>	0,43 (0,59-9,79)	58,53
<b>Cangrejo mar</b>	1,12 (0,81-5,17)	74,19
<b>Cangrejo río</b>	2,01 (0,67-5,24)	73,33
<b>Langosta</b>	0,72 (0,66-5,77)	67,14
<b>Calamar</b>	3,02 (2,19-31,4)	56,09
<b>Almeja</b>	1,51 (0,62-11,3)	50
<b>Pulpo</b>	2,25 (1,03-21,6)	55
<b>Vieira</b>	0,98 (0,42-4,56)	51,72
<b>Caracol</b>	1,48 (0,89-4,62)	56,25
<b>Ostra</b>	1,99 (0,74-5,05)	54,54
<b>Mejillón</b>	2,18 (0,95 – 17,2)	51,21

## 5. Clasificación por grupos

En base a los resultados de las pruebas de PODCCP con gamba, se distribuyeron a los pacientes en dos grupos. Un tercer grupo incluyó a los pacientes seleccionados alérgicos a ácaros.

- Grupo A, pacientes con PODCCP positiva: 17 pacientes (10 pacientes con PODCCO con gamba positiva más 7 pacientes con anafilaxia por gamba reciente).
- Grupo B, pacientes con PODCCP con gamba negativa: 24 pacientes. De los 31 pacientes con PODCCP negativa se excluyeron 7 por presentar prueba cutánea e IgE específica a gamba y tropomiosina negativas.
- Grupo C: Pacientes alérgicos a ácaros y PODCCP con gamba negativa: 8 pacientes.

En relación con la clasificación de los pacientes por grupos etarios, obtuvimos 17 pacientes de población pediátrica y 24 pacientes de población adulta.

Sin embargo, para el análisis de los grupos, consideramos exclusivamente aquellos pacientes con provocación positiva, por lo que la clasificación fue la siguiente:

- Grupo P: población pediátrica: 10 pacientes
- Grupo M: población adulta: 7 pacientes

## **6. Comparación de los pacientes según la expresividad clínica por exposición a gamba (Grupos A y B) y características descriptivas del grupo C**

Se compararon las características demográficas, clínicas e inmunológicas de cada uno de los grupos.

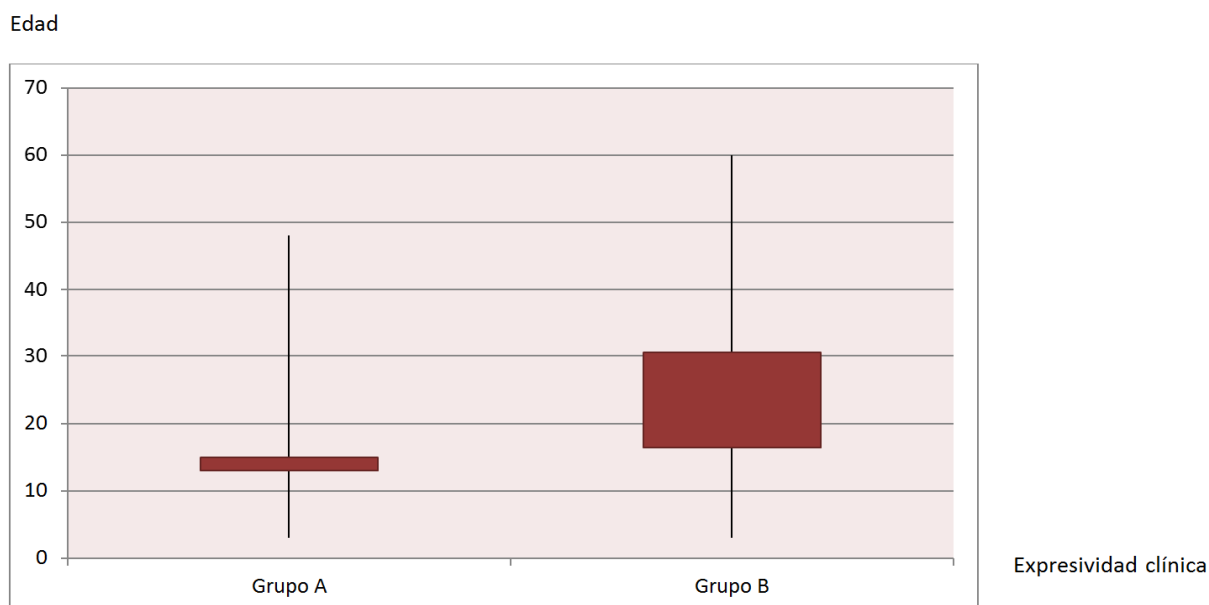
### **6.1. Perfil del paciente**

#### **6.1.1. *Características demográficas***

- Sexo y edad: Los pacientes del grupo A eran 9 varones (52,9%) y 8 mujeres (47,1%), de edades comprendidas entre los 3 y los 48 años (mediana 15 años).

Los del grupo B eran 9 varones (37,5%) y 15 mujeres (62,5%), de edades comprendidas entre los 3 y los 60 años (mediana 30,5 años).

La diferencia de edad de los pacientes de cada grupo se muestra en Figura 11. No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,9212$ ).



**Figura 11.** Relación entre la edad y la expresividad clínica. Grupo A: Pacientes alérgicos a gamba; Grupo B: Pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes.

- Lugar de origen:

Grupo A: 12 de los 17 (70,58%) pacientes eran procedentes de Madrid, uno de ellos de Rep. Dominicana, otro de Ecuador, otro de Sevilla, otro de Austria y finalmente uno de Portugal.

En el grupo B, 14 de 24 (58,33%) pacientes eran madrileños. Los restantes sujetos procedían de Granada, Segovia, País Vasco, Cáceres, Teruel, Japón, Rumanía, Portugal, Paraguay y Argentina.

Estos datos se muestran en la Figura 12.



**Figura 12.** Distribución del lugar de origen de la población estudiada y su correlación con la expresividad clínica. Los puntos rojos indican los pacientes pertenecientes al grupo A. Los puntos verdes son los pacientes del grupo B. En negro, los pacientes del grupo C alérgicos a ácaros.

#### 6.1.2. Características de los síntomas tras exposición a gamba

##### - Vía de exposición al alérgeno:

En el grupo A, 2 pacientes (11,76%) referían síntomas exclusivamente tras inhalación de vapor de cocción y uno exclusivamente tras contacto cutáneo. El resto de los pacientes (82,35%) relataban síntomas tras ingestión de gamba.

En el grupo B, 2 pacientes (8,33%) presentaban síntomas exclusivos tras contacto cutáneo, refiriendo el resto síntomas tras la ingestión.

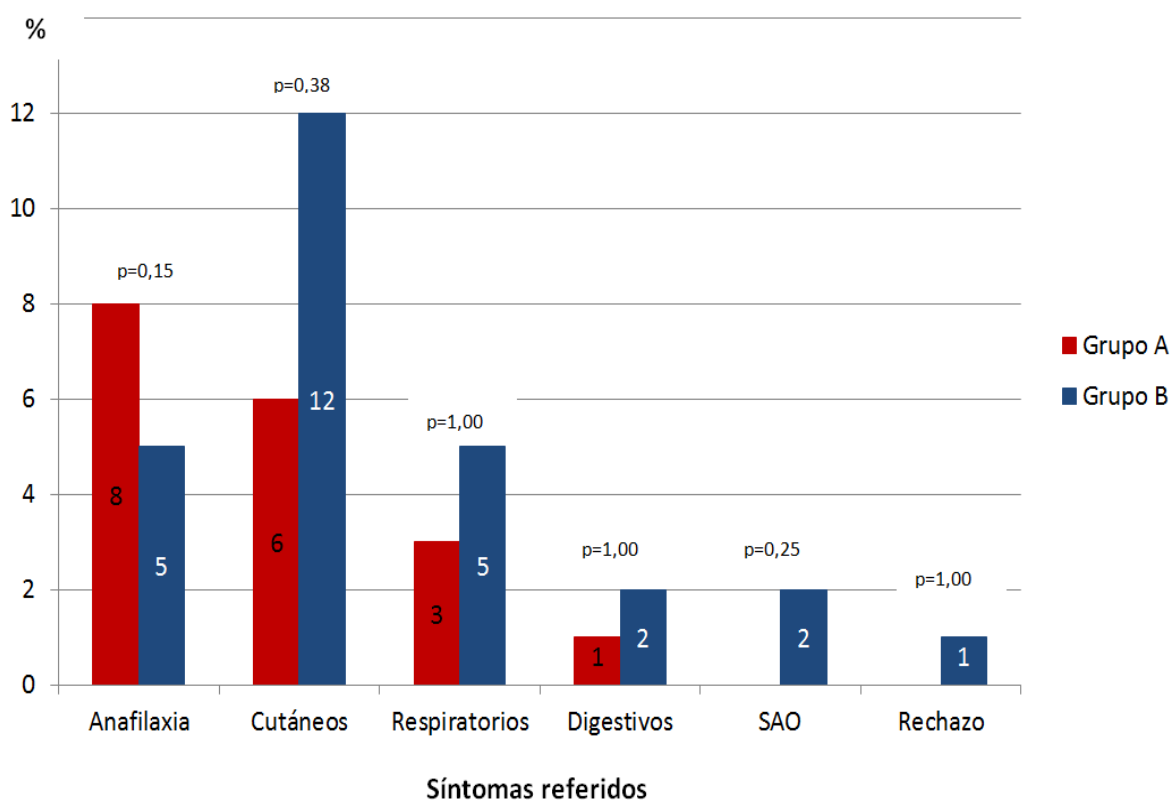
##### - Síntomas percibidos tras exposición a gamba:

De los 17 pacientes del grupo A, 7 (41,17%) pacientes refirieron anafilaxia, 6 (35,29%) síntomas cutáneos, 3 (17,64%) síntomas respiratorios de los cuales uno eran

síntomas rinoconjuntivales y dos pacientes relataban síntomas de asma, 1 (5,88%) paciente refería síntomas digestivos. Ninguno de los pacientes que relataban síndrome de alergia oral tuvo una PODCCP positiva.

De los 24 pacientes del grupo B, 12 (50%) referían síntomas cutáneos, 5 (20,83%) síntomas respiratorios (3 rinoconjuntivitis y 2 síntomas asmáticos), 4 (16,66%) síntomas de anafilaxia, 3 (12,5%) SAO y 2 (8,33%) síntomas digestivos.

Estos datos se muestran en la Figura 13. No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los síntomas percibidos entre los dos grupos, tal y como se muestra.



**Figura 13.** Relación porcentual de pacientes que presentan cada uno de los síntomas referidos tras la ingestión de gamba según la expresividad clínica y significación estadística entre los dos grupos. Grupo A: Pacientes alérgicos a gamba; Grupo B: Pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes.

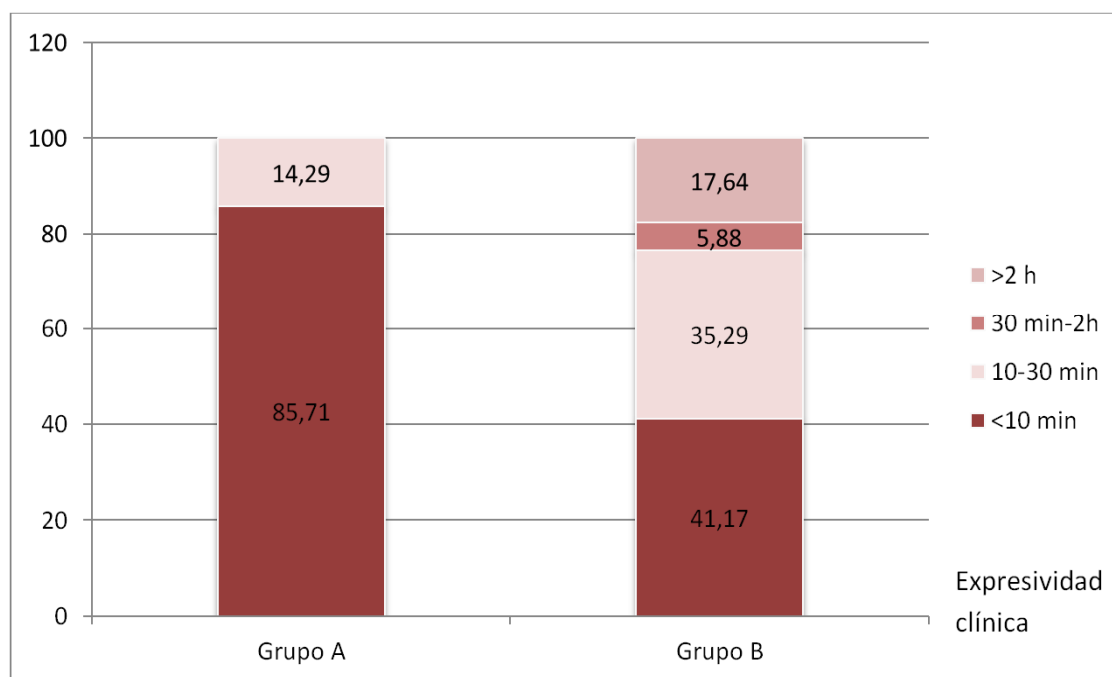
- Tiempo de latencia:

En el grupo A, todas las reacciones ocurrieron durante la primera media hora, siendo en 12 (85,71%) pacientes durante los primeros 10 min.

En los pacientes del grupo B, las reacciones ocurrieron en los primeros 10 min en 7 (41,17%) pacientes, entre 10 y 30 min en 6 (35,29%) pacientes, entre 30 min y 2 h en 1 (5,88%) y en más de 2 horas en 3 (17,64%) pacientes.

La Figura 14 muestra el tiempo de aparición de los síntomas según expresividad clínica. En él se puede observar que los pacientes del grupo A alérgicos a gamba, presentan los síntomas de forma más inmediata que los del grupo B en los que no se ha confirmado el diagnóstico ( $p=0,05$ ).

% pacientes



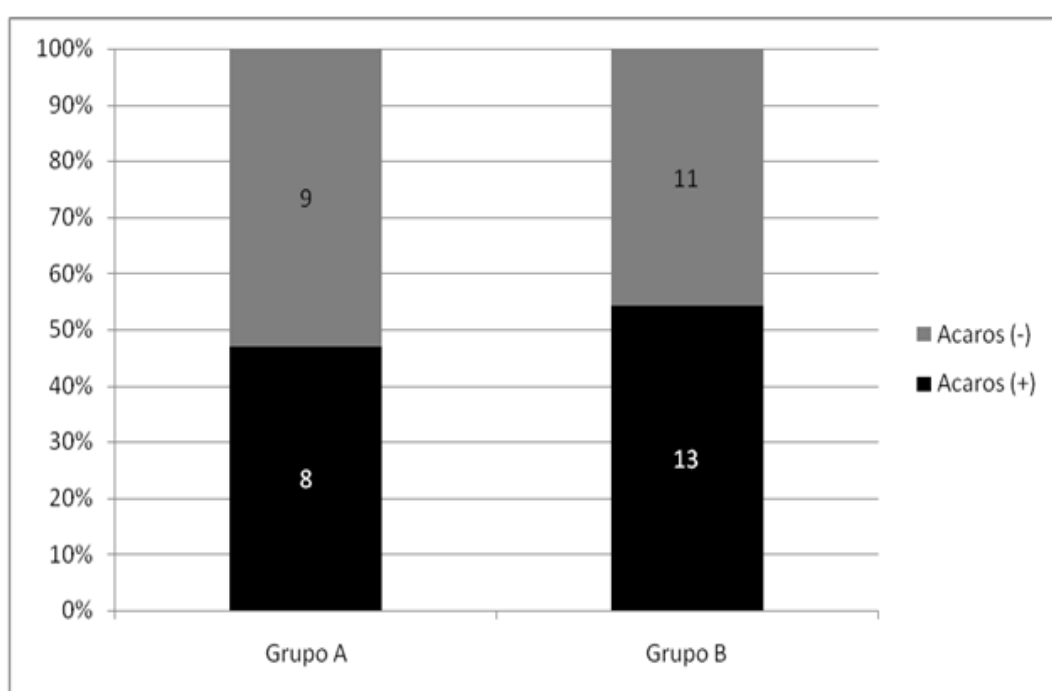
**Figura 14.** Relación entre el tiempo de latencia de aparición de los síntomas y la expresividad clínica. Grupo A: Pacientes alérgicos a gamba; Grupo B: Pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes.



### 6.1.3. Características de los síntomas tras exposición a ácaros en pacientes con síntomas con gamba

De los pacientes con síntomas tras la ingestión de gamba, 21 eran también alérgicos a ácaros, de los cuales 8 pertenecían al grupo A (38,09%), 3 de ellos padecían asma y el resto (61,90%) al grupo B. El 47,05% (8/17) de los pacientes del grupo A eran alérgicos a ácaros y el 54,16 % (13/24) de los del grupo B.

Los resultados se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Porcentaje de pacientes alérgicos a ácaros, según su expresividad clínica con gamba. Grupo A: Pacientes alérgicos a gamba; Grupo B: Pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes.

### 6.1.4. Morbilidad asociada

Los síntomas percibidos con otros parásitos y/o insectos fueron los siguientes:

- De 6 pacientes que reportaban síntomas en ambientes en los que había cucarachas, 3 sujetos (3/6; 50%) pertenecían al grupo A, y los otros 3 al grupo B.

- De 7 pacientes que presentaban síntomas con anisakis, 5 pertenecían al grupo de provocación positiva (5/7; 71,42%).

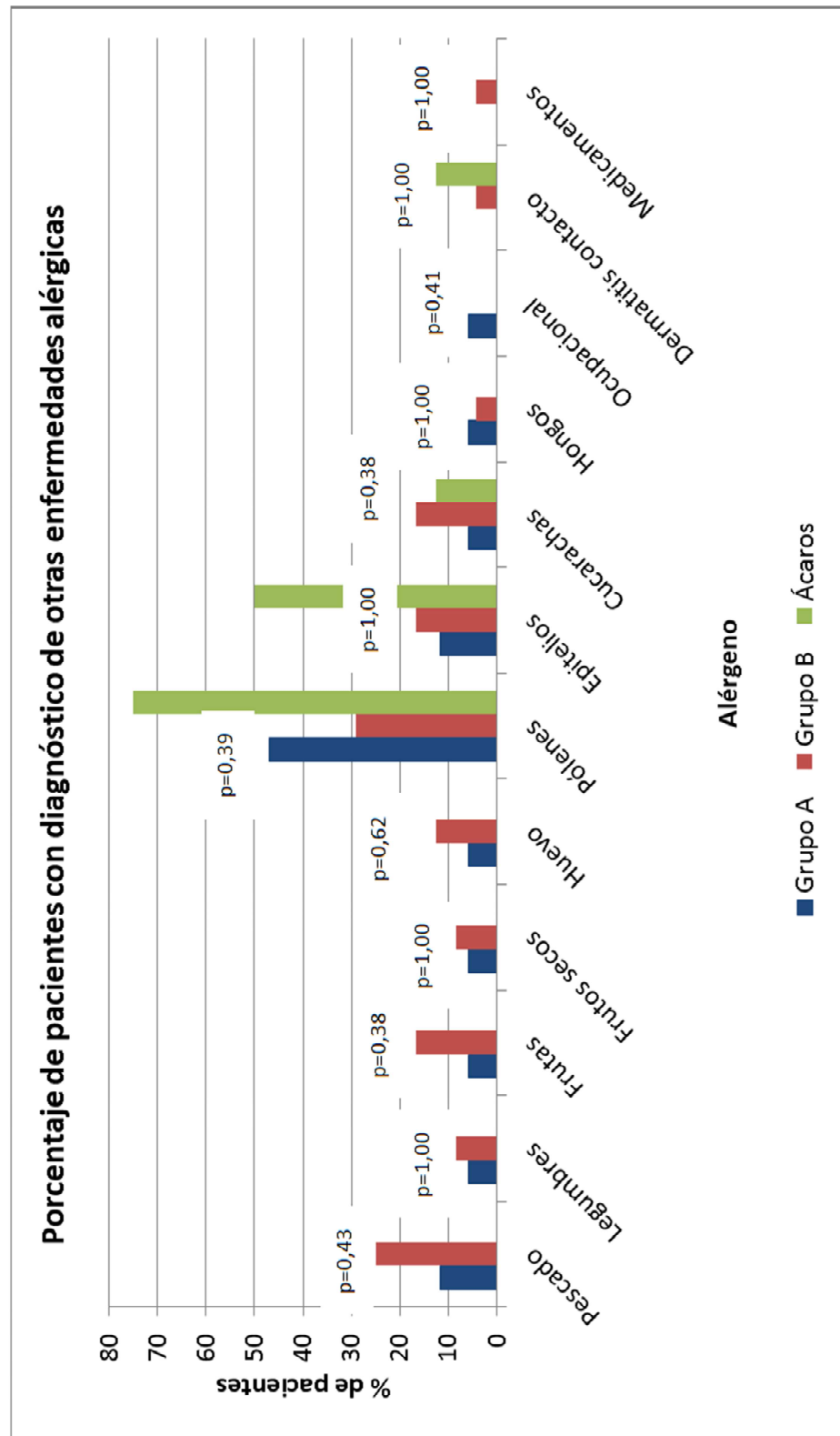
- Ningún paciente del grupo A refería síntomas tras picadura de mosquito (0/2).

La frecuencia de diagnóstico previo de otra alergia concomitante, la frecuencia por grupos resultó la siguiente:

- Otros alimentos: La mayor parte de los pacientes alérgicos a otros alimentos resultaron en una provocación negativa. El 75% (6/8) de pacientes alérgicos a pescado pertenecían al grupo B, mientras que 2 eran pacientes del grupo A (2/8; 25%) ( $p=0,43$ ). De los alérgicos a frutas, pertenecían al grupo A el 6,66% (1/5), de los alérgicos a huevo el 25% (1/4) ( $p=0,38$ ), de los alérgicos a legumbres 33,33% (1/3) ( $p=1,00$ ) y resultaron en provocación positiva el 33,33% de los alérgicos a frutos secos ( $p=0,01$ ).

- Aeroalérgenos: La frecuencia de diagnóstico de alergia a alérgenos ambientales fue la siguiente: pólenes (8/15; 53,33%), epitelios (2/6; 33,33%), cucarachas (1/5; 20%), hongos (1/2; 50%), agentes ocupacionales (1/1; 100%).

Se observó una mayor prevalencia de la mayoría de las enfermedades alérgicas asociadas entre los pacientes del grupo B que los del grupo A, tanto para alérgenos alimentarios como inhalantes, pero en ningún caso con significación estadística ( $p>0,3$  en todos los casos). Las únicas excepciones observadas fueron los pólenes, ya que en el grupo A había 47,05% de pacientes alérgicos a algún tipo de polen, mientras que en el grupo B sólo eran el 29,16% aunque no se halló diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,39$ ); los hongos (1/17; 5,88% para el grupo A y 1/24; 4,16% para el grupo B) ( $p=1,00$ ) y el único paciente estudiado que también padecía asma ocupacional, resultó en una provocación positiva. Estos resultados se muestran en la Figura 16, en el que además se incluye al grupo C.



**Figura 16.** Relación entre morbilidad alérgica asociada y expresividad clínica. Prevalencia de pacientes con otras enfermedades alérgicas en los grupos A (alérgicos a gamba), B (pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes) y C (pacientes alérgicos a ácaros y tolerantes a gamba) y significación estadística entre los grupos A y B.

## 6.2. Comparación de resultados de las pruebas cutáneas

Los resultados de las pruebas cutáneas realizadas en los grupos A, B y C se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Resultados de las pruebas cutáneas positivas y su comparación según expresividad clínica					
		Grupo A	Grupo B	p	Grupo C
Invertebrados	Anisakis	8 (53,3%)	8 (33,33%)	0,50	1 (12,5%)
	Ácaros	8 (80%)	4 (17,39%)	<b>0,02</b>	8 (100%)
	Cucaracha	7 (87,5%)	6 (37,5%)	0,09	1 (12,5%)
	Mosquito	8 (61,53%)	4 (17,39%)	0,15	2 (25%)
Mariscos	Gamba	17 (100%)	13 (54,16%)	<b>0,05</b>	0
	Calamar	13 (76,47%)	12 (50%)	0,40	1 (12,5%)
	Almeja	14 (82,35%)	6 (25%)	<b>0,0007</b>	0
	Pulpo	13 (76,47%)	5 (20,83%)	<b>0,05</b>	1 (12,5%)
	Vieira	14 (82,35%)	7 (29,16%)	<b>0,005</b>	0
	Caracol	10 (58,82%)	8 (33,33%)	0,24	0
	Berberecho	12 (70,58%)	4 (16,66%)	0,02	0
	Mejillón	11 (64,70%)	3 (12,5%)	0,01	0

Los resultados se muestran en número absoluto de positividad, y entre paréntesis el porcentaje de pacientes con resultado positivo. La p muestra la diferencia estadística (significativa <0,05) entre los grupos A y B. Grupo A: Pacientes alérgicos a gamba; Grupo B: Pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes.; Grupo C: Pacientes alérgicos a ácaros que toleran gamba.

### 6.2.1. Prueba cutánea a gamba

La prueba cutánea a gamba resultó positiva en la totalidad de los pacientes del grupo A y en más de la mitad (54,16%) de los pacientes grupo B, con diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,05$ ).

Por otra parte, los pacientes alérgicos a ácaros mostraron todos ellos una prueba cutánea negativa a gamba.

### 6.2.2. Prueba cutánea a otros invertebrados

Se observó mayor porcentaje de sensibilización entre los pacientes del grupo A para todos los extractos testados, obteniendo únicamente diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo B en el caso de los ácaros –tanto *D.pteronysinus* como *D.farinae*- (8/10; 80%), ( $p=0,02$ ). Tabla VI.

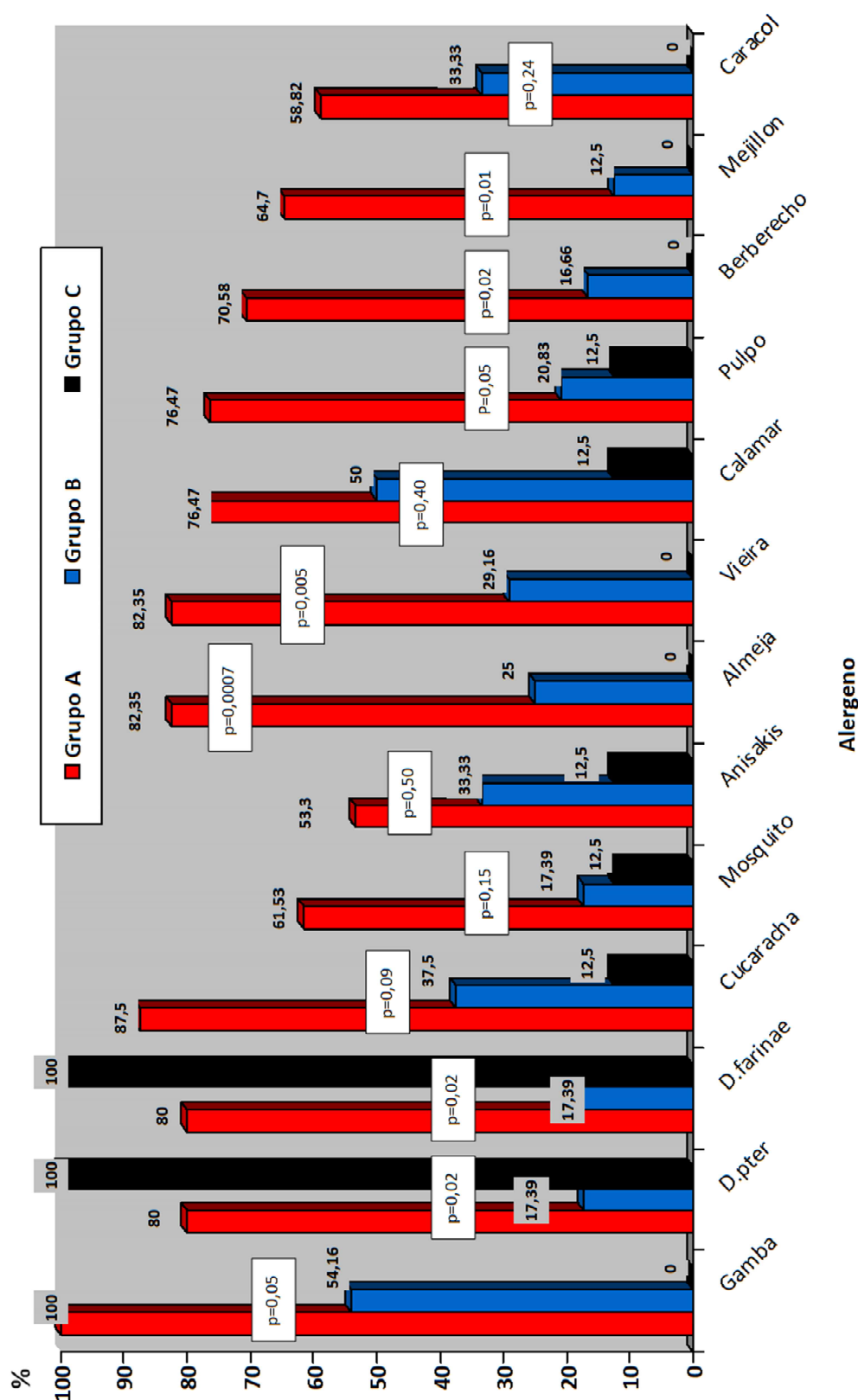
Entre los pacientes alérgicos a ácaros (grupo C), sólo un paciente presentó prueba cutánea positiva a anisakis (1/8; 12,5%). Este mismo paciente estaba sensibilizado a cucaracha (1/8; 12,5%), dos pacientes a mosquito (2/8; 25%).

### 6.2.3. Prueba cutánea frente a otros mariscos

Las pruebas cutáneas frente a otros mariscos mostraron mayor positividad en el grupo de los pacientes no tolerantes a gamba (Grupo A) que en aquellos que la toleraron (Grupo B). Tabla IV.

Se obtuvo diferencia significativa entre el porcentaje de pacientes sensibilizados de ambos grupos en el caso de la prueba cutánea a gamba ( $p=0,05$ ), almeja ( $p=0.0007$ ), pulpo ( $p=0.05$ ), vieira ( $p=0.005$ ), berberecho ( $p=0,02$ ) y mejillón ( $p=0,01$ ). No se halló diferencia únicamente para calamar y caracol.

Entre los pacientes alérgicos a ácaros del grupo C, solamente un paciente presentaba prueba cutánea positiva a calamar y pulpo, resultando negativo el resto de las pruebas cutáneas. Los resultados se muestran en la Figura 17.



**Figura 17.** Resultado de las pruebas cutáneas positivas en función de la expresividad clínica. Porcentaje de pacientes de los grupos A (alérgicos a gamba), B (sensibilizados a gamba y tolerantes) y C (alérgicos a ácaros que toleran gamba) con pruebas cutáneas positivas en función de la expresividad clínica y significación estadística entre los grupos A (en rojo), B (en azul) y C (en negro).

### 6.3. Comparación de resultados de IgE entre los grupos de pacientes

Los resultados de la determinación de IgE sérica total e IgE específica a gamba, tropomiosina, otros invertebrados y otros mariscos relacionados se analizaron en función de la expresividad clínica de la exposición a gamba.

#### 6.3.1. *IgE total*

Los resultados de IgE total mostraron resultados muy similares tanto en el grupo A como en el B.

En el grupo A, abarcaba unos valores entre 66,4 y 1257 kU/l, con una mediana 327,2 kU/l. En el grupo B, los valores oscilaron entre 7 y 1373, con una mediana 239,3 kU/l.

#### 6.3.2. *IgE específica a gamba*

En relación con la IgE específica a gamba, el grupo A presentó un rango intercuartílico, así como una mediana superior al grupo B, con diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ). Tabla VII.

#### 6.3.3. *IgE específica a tropomiosina*

La IgE específica a tropomiosina fue considerablemente superior en los pacientes del grupo A que en el grupo B con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Tabla VII.

Tabla VII. Valores de IgE específica a gamba y tropomiosina				
	Grupo A	Grupo B	p	Grupo C
<b>Gamba</b>	9,78 (2,47-100) [100%]	0,61 (0-2,19) [70,83%]	<b>&lt;0,0001</b>	4,26 (0,00-5,77) [25%]
<b>Tropomiosina</b>	6,59 (2,31-15,85) [94,11%]	0,00 (0,00-0,39) [33,33%]	<b>&lt;0,0001</b>	0

Los resultados se muestran en medianas y, entre paréntesis, el rango intercuartílico. Entre corchetes se muestra el porcentaje de pacientes que presentaron IgE específica >0,35 kU/. Grupo A: Pacientes alérgicos a gamba, Grupo B: Pacientes sensibilizados a gamba y tolerantes, Grupo C: Pacientes alérgicos a ácaros que toleran gamba. p= significación entre los grupos A y B.

#### 6.3.4. IgE específica a otros invertebrados

En cuanto a la IgE específica a otros invertebrados, se observaron también valores más altos para el grupo A que el grupo B, observando diferencia estadísticamente significativa en todos ellos, siendo ésta mayor en el caso del mosquito.

Los resultados se muestran en la Tabla VIII, así como la descripción del grupo C.

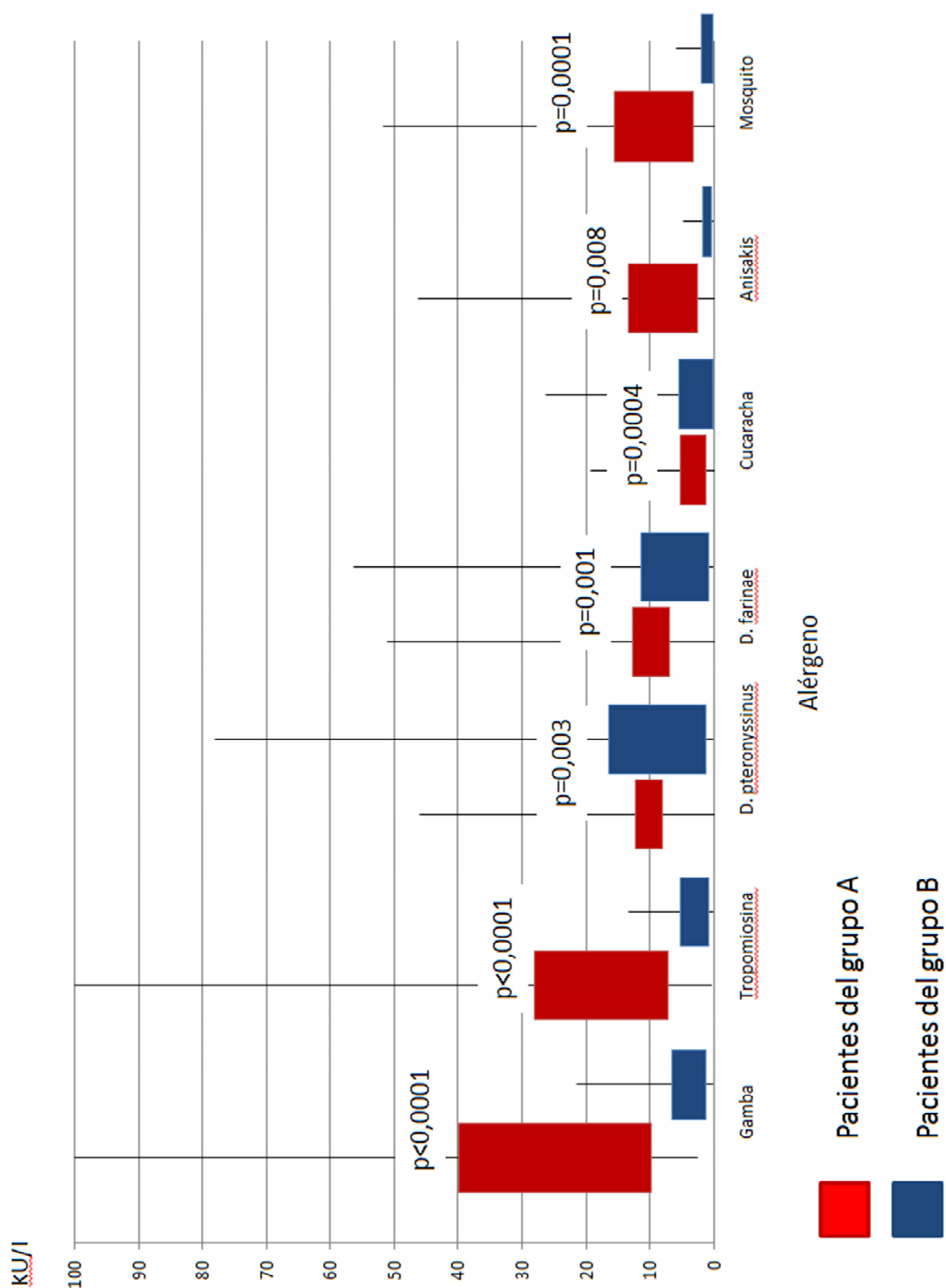


**Tabla VIII. Valores de IgE específica a invertebrados según expresividad clínica**

	Grupo A		Grupo B		p	Grupo C	
	kU/l	%	kU/l	%		kU/l	%
Anisakis	1,3 (0,40-5,29)	86,6 6	0,00 (0,00-1,18)	37,5	<b>0,0089</b>	1,15 (0,00-4,37)	42,85
D.pter.	8,02 (1,68-13,95)	93,7 5	0,84 (0,26-2,01)	75	<b>0,0038</b>	4,02 (0,35-8,56)	85,71
D.farinae	6,86 (2,02-12,97)	93,7 5	0,68 (0,00-2,14)	70,83	<b>0,0015</b>	2,66 (0,35-12,3)	57,14
Cucaracha	2,59 (1,69-15,63)	93,7 5	0,24 (0,00-3,56)	54,16	<b>0,0004</b>	0,88 0,00-1,29)	12,5
Mosquito	3,29 (1,93-18,65)	93,7 5	0,00 (0,00-0,70)	45,83	<b>0,0001</b>	2,99 (0,87-2,76)	12,5

Se muestran las medianas de IgE específica en kU/l de los grupos A, B y C y diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A y B. Entre paréntesis se muestran los cuartiles. El porcentaje muestra los pacientes con IgE específica >0,35 kU/l.

Los resultados comparativos entre los grupos A y B se muestran en la Figura 18.



**Figura 18.** Relación de los valores de IgE específica a gamba, tropomiosina e invertebrados según expresividad clínica

#### *6.3.5. IgE específica a otros mariscos*

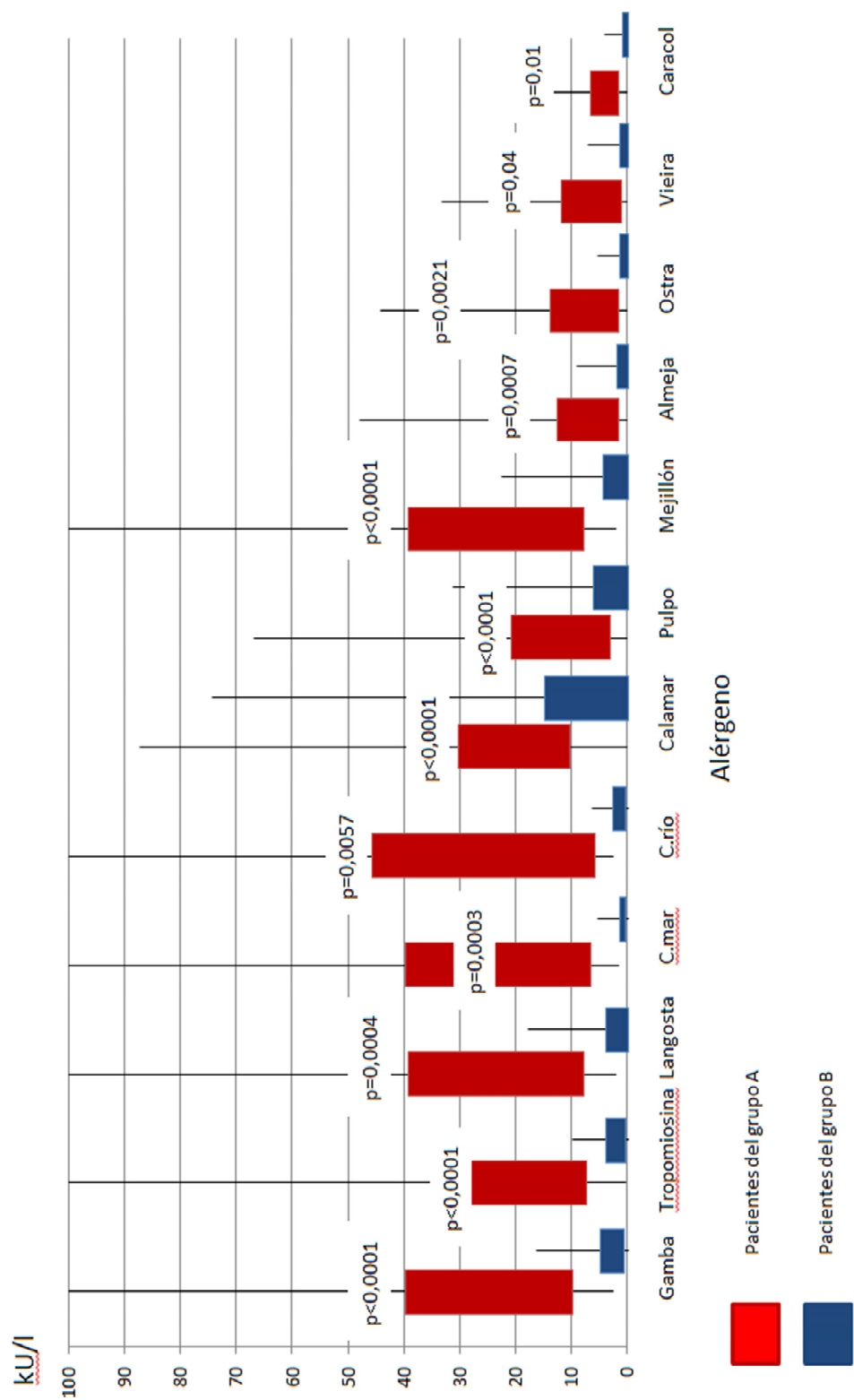
Los resultados de la IgE específica a otros mariscos, fueron superiores en los pacientes del grupo A que en el grupo B, con diferencia estadísticamente significativa especialmente reseñable en el caso de cefalópodos como el pulpo y el calamar, y bivalvos como el mejillón.

En el caso del grupo de pacientes alérgicos a ácaros, la detección de IgE específica a otros mariscos ocurrió en un porcentaje muy bajo, o inexistente, de pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. Valores de IgE específica a otros mariscos							
	Grupo A		Grupo B		p	Grupo C	
	kU/l	%	kU/l	%		kU/l	%
Cangrejo mar	5,41 (4,32-7,79)	100	0,46 (0,00-1,12)	60	<b>0,0003</b>	1,14	14,28
Cangrejo río	3,99 (3,79-5,79)	100	0,50 (0,00-1,04)	60	<b>0,0057</b>	2,01	14,28
Langosta	4,95 (3,57-10,88)	100	0,22 (0,00-0,81)	50	<b>0,0004</b>	0	0
Calamar	10,21 (2,61-36,15)	94,11	0,00 (0,00-0,42)	29,16	<b>&lt;0,0001</b>	2,57	12,5
Almeja	1,56 (0,56-12,60)	81,25	0,00 (0,00-0,58)	29,16	<b>0,0007</b>	0,47	12,5
Pulpo	3,13 (1,47-24,90)	93,75	0,00 (0,00-0,38)	29,16	<b>&lt;0,0001</b>	0	0
Vieira	1,06 (0,27-10,49)	77,77	0,00 (0,00-0,48)	40	<b>0,0473</b>	0	0
Caracol	1,43 (0,70-7,92)	83,33	0,00 (0,00-1,05)	40	<b>0,0182</b>	2,10	28,57
Ostra	1,59 (0,74-10,95)	91,66	0,00 (0,00-0,61)	33,33	<b>0,0021</b>	2,15	12,5
Mejillón	3,17 (1,26-17,47)	88,23	0,00 (0,00-0,14)	25	<b>&lt;0,0001</b>	0	0

Se muestran las medianas de IgE específica en kU/l de los grupos A, B y C y diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A y B. Entre paréntesis se muestran los cuartiles. El porcentaje muestra los pacientes con IgE específica >0,35 kU/l.

Los resultados comparativos entre los grupos A y B y su significación estadística se muestran en la Figura 19.

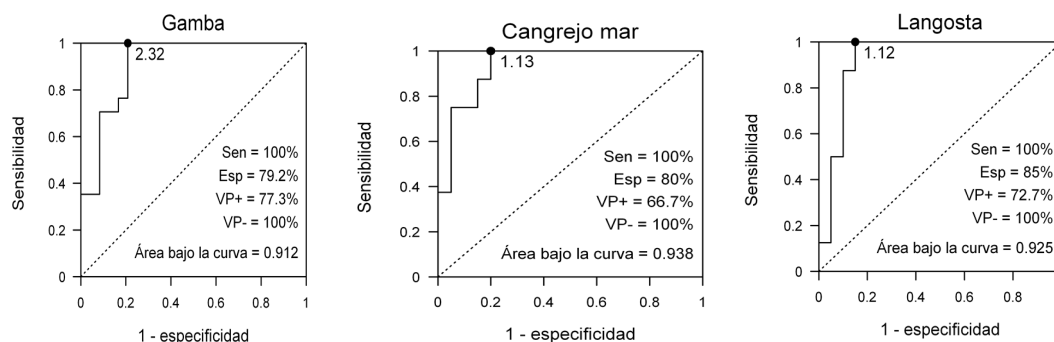


**Figura 19.-** Comparación de los valores de IgE específica a gamba, tropomiosina y otros mariscos según expresividad clínica. C.mar: Cangrejo de mar; C.rio: Cangrejo de río.

### 6.3.6. Curvas ROC

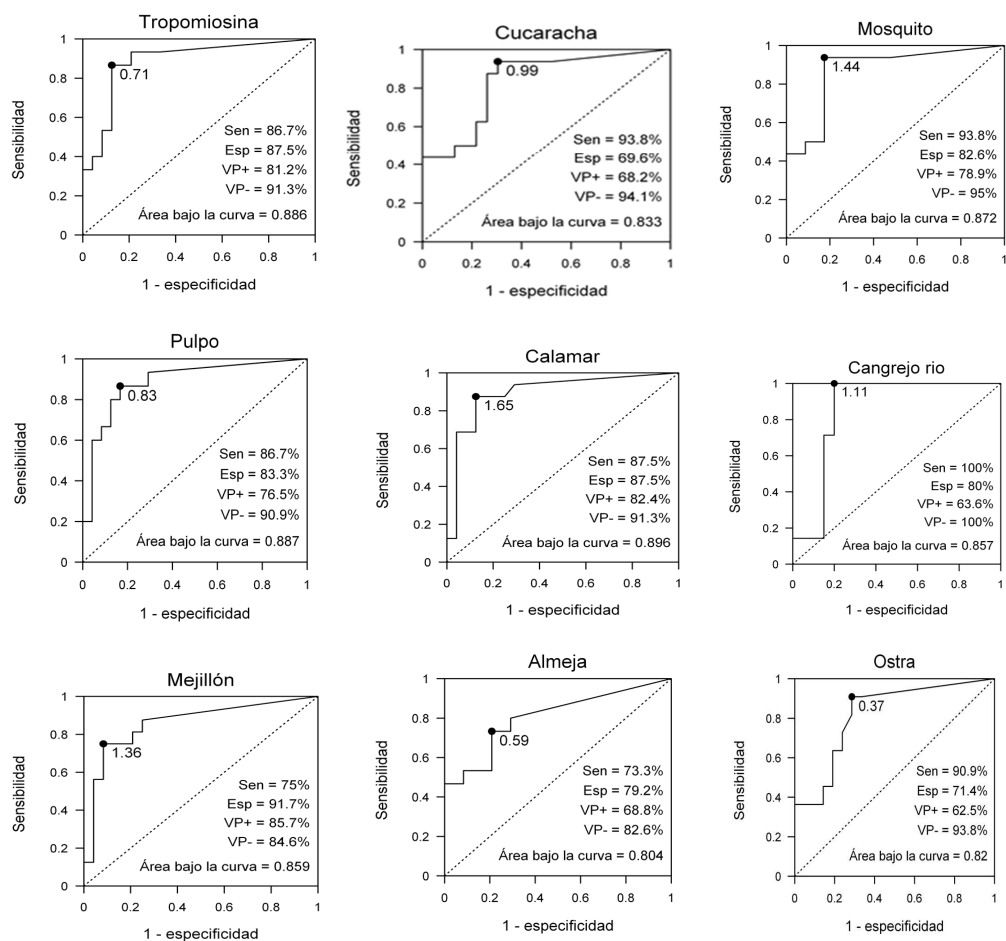
Se calcularon los valores de IgE específica que podían predecir una PDCCP positiva. Así, se halló que la sensibilidad y especificidad se veían maximizadas simultáneamente, con una capacidad muy buena para discriminar pacientes alérgicos a gamba, siendo superior a 0,9 con una IgE específica a gamba  $\geq 2,32$  kU/l, a cangrejo de mar  $\geq 1,13$  kU/l, a langosta  $\geq 1,12$  kU/l (Figura 20) Esta capacidad es buena (superior a 0,8) para predecir una provocación positiva si la IgE específica a cucaracha es  $\geq 0,99$ , a mosquito  $\geq 1,44$ , a tropomiosina  $\geq 0,71$ , a cangrejo de río  $\geq 1,11$  a calamar de 1,65, a almeja  $\geq 0,59$ , a pulpo de 0,83, a ostra de 0,37 y a mejillón de 1,36 kU/l. (Figura 21).

Aquellos alérgenos con pobre capacidad para discriminar a los pacientes alérgicos a gamba se muestran en la Figura 22.

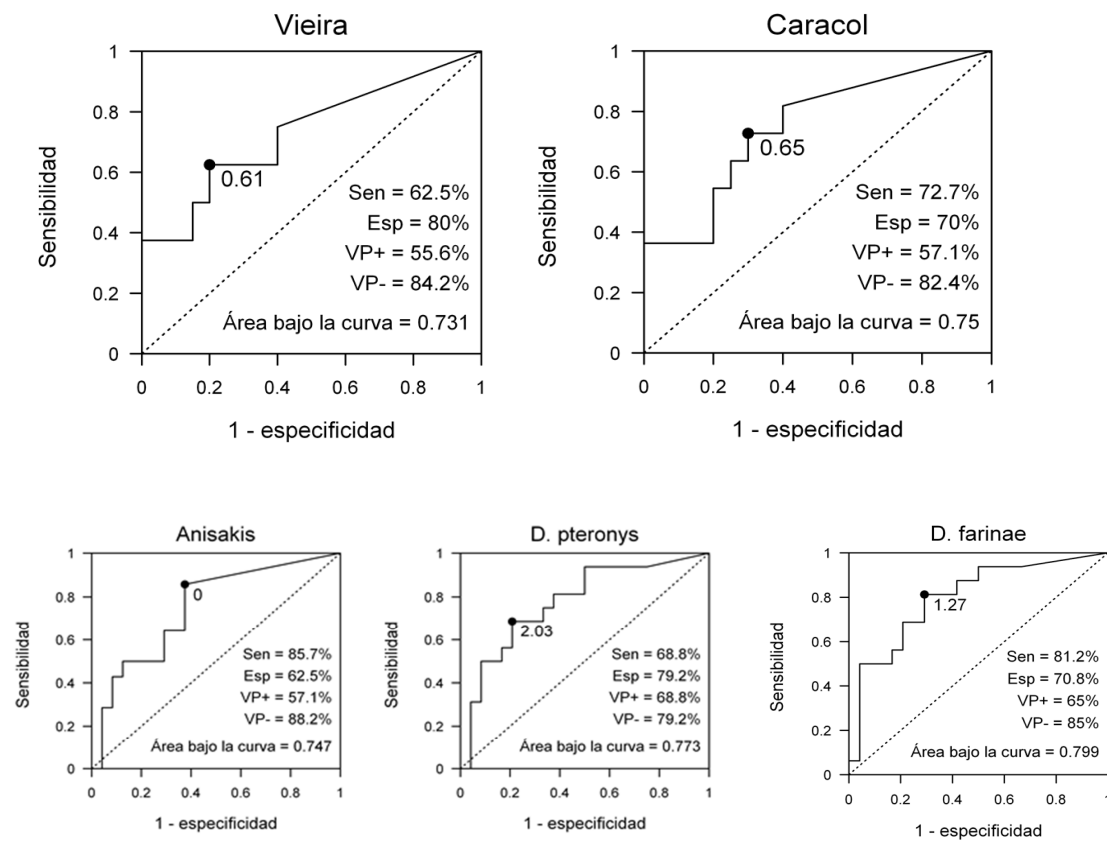


**Figura 20.** Curvas ROC para los alérgenos cuya IgE específica muestran una capacidad superior a 0,9 para discriminar pacientes alérgicos a gamba.

## Resultados



**Figura 21.** Curvas ROC para los alérgenos cuya IgE específica muestran una capacidad superior a 0,8 para discriminar pacientes alérgicos a gamba.



**Figura 22.** Curvas ROC para los niveles de IgE específica a invertebrados con capacidad pobre para discriminar pacientes alérgicos a gamba



## 7. Comparación de los pacientes según la edad (Grupos P y M)

Se compararon las características demográficas, clínicas e inmunológicas de cada uno de los grupos. Los resultados se muestran en la Tabla X.

		Edad				
		Niños (1-18 años) N=17	Adultos (19-60 años) N=24	P		
Sexo* (N de Varones)		8 (47,05%)	9 (37,5%)			
Provocación (N de positivas)		10 (58,82%)	7 (29,16%)			
Síntomas	Cutáneos	8 (47,05%)	15 (62,5%)	0,9814		
	Anafilaxia	2 (11,76%)	11 (45,83%)	0,3092		
	Respiratorios	3 (17,64%)	5 (20,83%)	0,2896		
	Digestivos	2 (8,33%)	3 (6%)	0,5598		
	SAO	1 (2%)	0	0,2537		
	Rechazo	1 (2%)	0	0,4146		
Tiempo de latencia	<10 min	10 (100%)	19 (79,16%)	0,0120		
	10-30 min	0	10 (20%)			
	30 min-2h	0	2 (8,33%)			
	>2h	0	4 (16,66%)			
Morbilidad asociada	Alimentos	Pescado	5 (29,41%)	3 (12,5%)		
		Frutas	3(17,64%)	2 (8,33%)		
		Huevo	4 (23,52%)	0		
		Legumbres	3(17,64%)	0		
		F. secos	3 (17,64%)	0		
	Inhalantes	Pólenes	9 (52,94%)	6 (25%)		
		Epitelios	2 (11,76%)	4 (16,66%)		
		Cucarachas	2 (11,76%)	3 (12,5%)		
		Hongos	1 (5,88%)	1 (4,16%)		
		Ocupacional	0	1 (5,88%)		
	Otr	D. contacto	0	1 (4,16%)		
		Medicamentos	0	1 (4,16%)		
Prueba cutánea	Invertebrado	Anisakis	6 (35,29%)	10 (41,66%)	1,0000	
		Acaros	6 (35,29%)	10 (41,66%)	1,0000	
		Cucaracha	4 (23,5%)	9 (37,5%)	1,0000	
		Mosquito	4 (23,5%)	7 (29,16%)	0,6245	
	Mariscos	Gamba	16 (94,11%)	21 (87,5%)	0,6180	
		Calamar	11 (64,70%)	13 (54,16%)	1,0000	
		Almeja	9 (52,94%)	12 (50%)	1,0000	
		Pulpo	10 (58,82%)	10 (41,66%)	0,6800	
		Vieira	10 (58,82%)	9 (37,5%)	0,5791	
		Caracol	5 (29,41%)	11 (45,83%)	0,6800	
		Berberecho	9 (52,94%)	8 (33,33%)	0,4444	
		Mejillón	7 (41,17%)	7 (29,16%)	0,3793	
	IgE específica	Invertebrad	Anisakis	1,00 (0,38-4,45)	0,00 (0,00-1,35)	0,03
			D. pteronys.	2,00 (0,86-10,50)	1,19 (0,43-6,14)	0,27
			D. farinae	2,28 (0,97-11,50)	0,83 (0,00-4,72)	0,16
			Cucaracha	2,96 (1,33-11,35)	0,48 (0,00-1,82)	0,0009
Mosquito			3,25 (1,65-10,20)	0,40 (0,00-1,81)	0,0093	
Otros mariscos		Gamba	11,70 (5,24-24,20)	1,14 (0,00-5,59)	0,0017	
		Tropomiosina	8,62 (0,48-16,60)	0,00 (0,00-1,04)	0,0004	
		Cangrejo mar	6,50 (1,69-35,20)	0,64 (0,00-3,21)	0,0065	
		Cangrejo río	8,31 (4,46-34,00)	0,74 (0,00-3,75)	0,0080	
		Langosta	12,09 (4,58-38,42)	0,50 (0,00-2,31)	0,0065	
		Calamar	3,06 (1,26-31,70)	0,00 (0,00-1,55)	0,0008	
		Almeja	1,56 (0,93-11,30)	0,00 (0,00-0,00)	<0,0001	
		Pulpo	2,25 (0,71-24,25)	0,00 (0,00-0,72)	0,0029	
		Vieira	4,57 (1,46-9,02)	0,00 (0,00-0,43)	0,0017	
		Caracol	3,42 (1,30-7,29)	0,00 (0,00-1,04)	0,0012	
		Ostra	4,67 (1,56-10,40)	0,00 (0,00-0,74)	0,0028	

En los resultados de la IgE específica, se muestra la mediana (P25-P75) En negrita se muestran los valores estadísticamente significativos para una  $p \leq 0,05$ . SAO: Síndrome de Alergia Oral.

Como se puede observar en la Tabla X, se hallaron diferencias significativas para la IgE específica determinada a todos los invertebrados (excepto ácaros) y mariscos testados, lo que puede conllevar un sesgo de selección al existir más número de pacientes con provocación positiva entre los niños (58,82%) que entre los adultos (29,16%). Por eso, como se ha comentado previamente en la descripción de los grupos, los resultados que se ofrecen a continuación se refieren exclusivamente a la diferencia entre población pediátrica y población adulta de pacientes con resultado de provocación positiva.

### 7.1. Perfil del paciente

#### 7.1.1. *Características demográficas*

##### - Sexo y edad:

Entre los pacientes alérgicos a gamba, no existieron diferencias de sexo entre los niños (entre los cuales había 5/10 varones: 55,6%) y los adultos (3/7; 42,9%), ( $p=1,00$ ).

La media de edad de la población adulta fue de 29 años, mientras que la de la población pediátrica fue de 8,6 años.

##### - Lugar de origen:

El 100% de los niños eran naturales y residían habitualmente en Madrid. De los pacientes adultos, sólo 2 (20%) eran madrileños, otros dos de Sudamérica (2; 20%), siendo los restantes de Sevilla, Austria y Portugal.

### 7.1.2. Características de los síntomas tras exposición a gamba

#### - Síntomas percibidos:

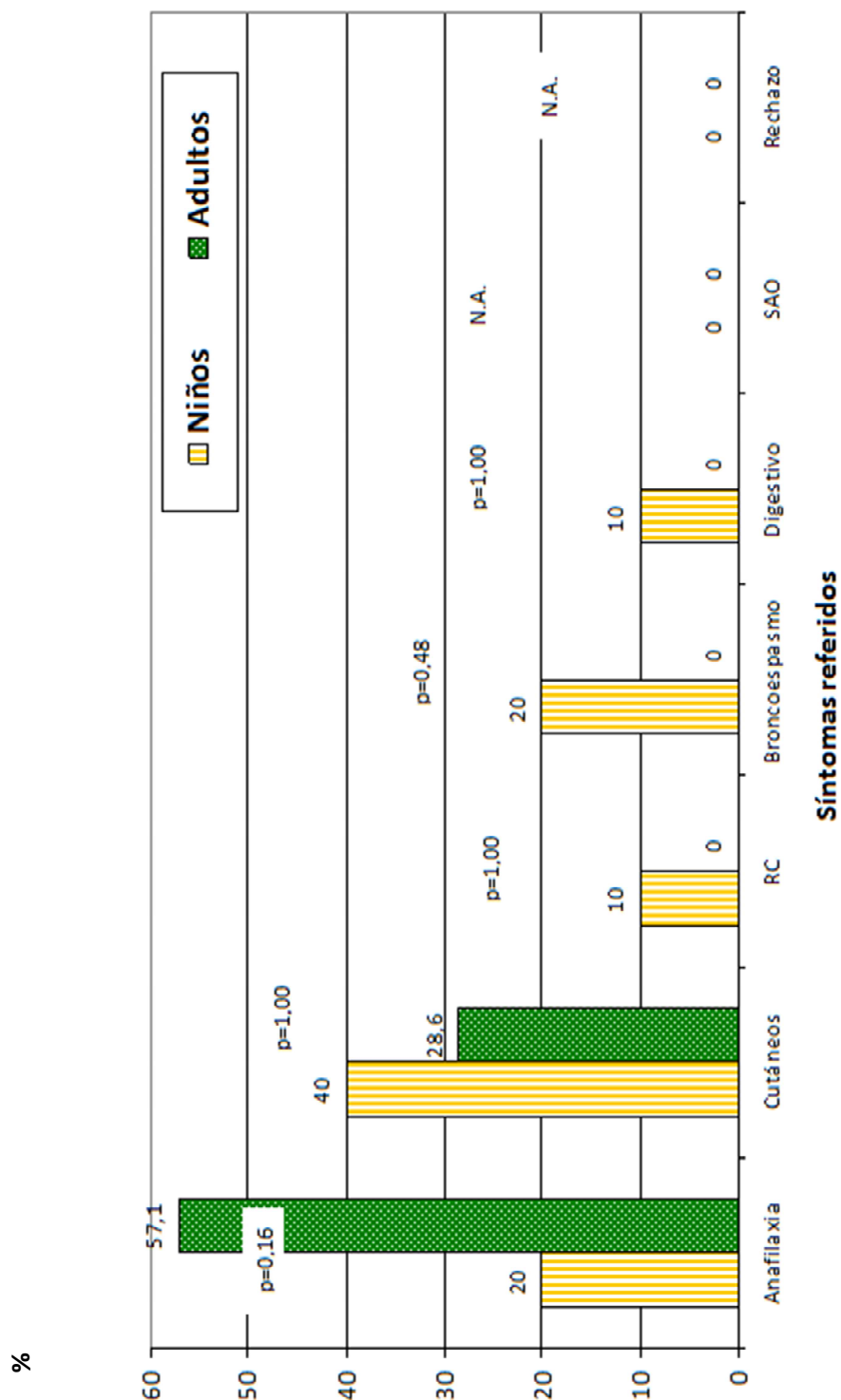
Entre los pacientes alérgicos a gamba, no existieron diferencias significativas entre la población pediátrica y la población adulta en relación a los síntomas referidos. Los síntomas rinoconjuntivales los refería 1 paciente del grupo P (1/10; 10%) y ningún o del M ( $p=1,00$ ); síntomas cutáneos 4 pacientes del grupo P (40%) y 2 del M (2/7; 28,6%) ( $p= 1,00$ ); 2 pacientes del grupo P referían anafilaxia (20%) y 4 del M (57,1%) ( $p= 0,16$ ). Los síntomas de broncoespasmo ocurrieron sólo en población pediátrica en 2 pacientes (20%) ( $p= 0,48$ ) y también los síntomas digestivos (1/10; 10%) ( $p=1,00$ ). Ningún paciente del grupo P y M que tuvieron una PODCCP positiva presentó síndrome de alergia oral o rechazo del alimento.

**Tabla XI. Sexo y síntomas percibidos tras la ingestión de gamba, según la edad de los pacientes N (%)**

		<b>Grupo P (N=10)</b>	<b>Grupo M (N=7)</b>	<b>p</b>
<b>Varones</b>		5 (55,6%)	3 (42,9%)	1,0000
<b>Síntomas</b>	Cutáneos	4 (40%)	2 (28,6%)	1,0000
	Anafilaxia	2 (20%)	4 (57,1%)	0,1618
	Respiratorios	2 (20%)	0	0,4853
	Digestivos	1 (10%)	0	1,0000
	SAO	0	0	N.A.
	Rechazo	0	0	N.A.
	RC	1 (10%)	0	1,0000

SAO: Síndrome de Alergia Oral; RC: Rinoconjuntivitis; N.A.: No Aplica

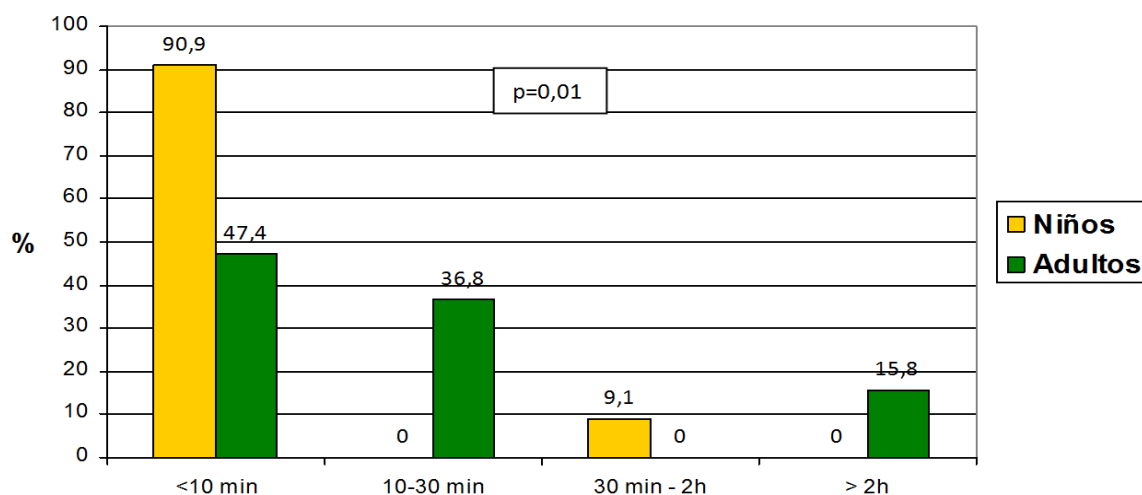
Los datos clínicos de los pacientes del grupo P y M con PODCCP positiva se muestran en la Figura 23.



**Figura 23.** Diferencias entre los síntomas percibidos, según el rango de edad, en los pacientes con PODCCP positiva y significación estadística. RC: rinoconjuntivitis. SAO: síndrome de alergia oral.

- Tiempo de latencia:

La relación entre el tiempo de aparición de los síntomas y la edad de los pacientes, se observa en la Figura 24.



**Figura 24.-** Relación entre el tiempo de latencia de aparición de los síntomas y la edad de los pacientes.

## 7.2. Comparación de resultados de las pruebas cutáneas

Los resultados de las pruebas cutáneas realizadas se compararon en función de los grupos según su edad.

### 7.2.1. *Prueba cutánea a gamba*

El 100% de los pacientes con PDCCP positiva de los dos grupos P y M presentaron una prueba cutánea positiva a gamba.

### 7.2.2. *Prueba cutánea a otros invertebrados*

Entre los pacientes con PODCCP positiva, no se hallaron diferencias entre los grupos P y M para el resultado de las pruebas cutáneas a anisakis, cucaracha,

mosquito y ácaros ( $p=1,00$ ,  $p= 0,44$ ,  $p=0,55$  y  $p=0,60$  respectivamente). Se muestran los datos en la Figura 25.



**Figura 25.** Comparación del resultado de las pruebas cutáneas positivas a invertebrados de los pacientes con reactividad clínica a gamba, en función de la edad.

### 7.2.3. Prueba cutánea frente a otros mariscos

Los datos de la positividad en las pruebas cutáneas y su diferencia estadística se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Pruebas cutáneas positivas a invertebrados entre los pacientes con PODCCP positiva, según edad				
		Grupo P (N=10)	Grupo M (N=7)	p
Invertebrados	Anisakis	5 (55,6%)	3 (60%)	1,0000
	Ácaros	6 (66,7%)	5 (83,3%)	0,6044
	Cucaracha	3 (60%)	4 (100%)	0,4444
	Mosquito	4 (40%)	3 (75%)	0,5594
Mariscos	Gamba	10 (100%)	7(100%)	N.A.
	Calamar	7 (70%)	6 (85,7%)	0,6029
	Almeja	8 (80%)	7 (100%)	0,4853
	Pulpo	7 (70%)	6 (85,7%)	0,6029
	Vieira	8 (80%)	6 (85,7%)	1,0000
	Caracol	4 (40%)	6 (85,7%)	0,1340
	Berberecho	7 (70%)	5 (71,4%)	1,0000
	Mejillón	6 (60%)	5 (71,4%)	1,0000

El resultado se muestra en número absoluto de positivities, y, entre paréntesis, el porcentaje de pacientes con prueba positiva del total de pacientes en los que se ha realizado la prueba.

Los resultados se muestran en la Figura 26.



**Figura 26.** Comparación del resultado de las pruebas cutáneas positivas a mariscos del grupo A, en función de la edad del paciente.

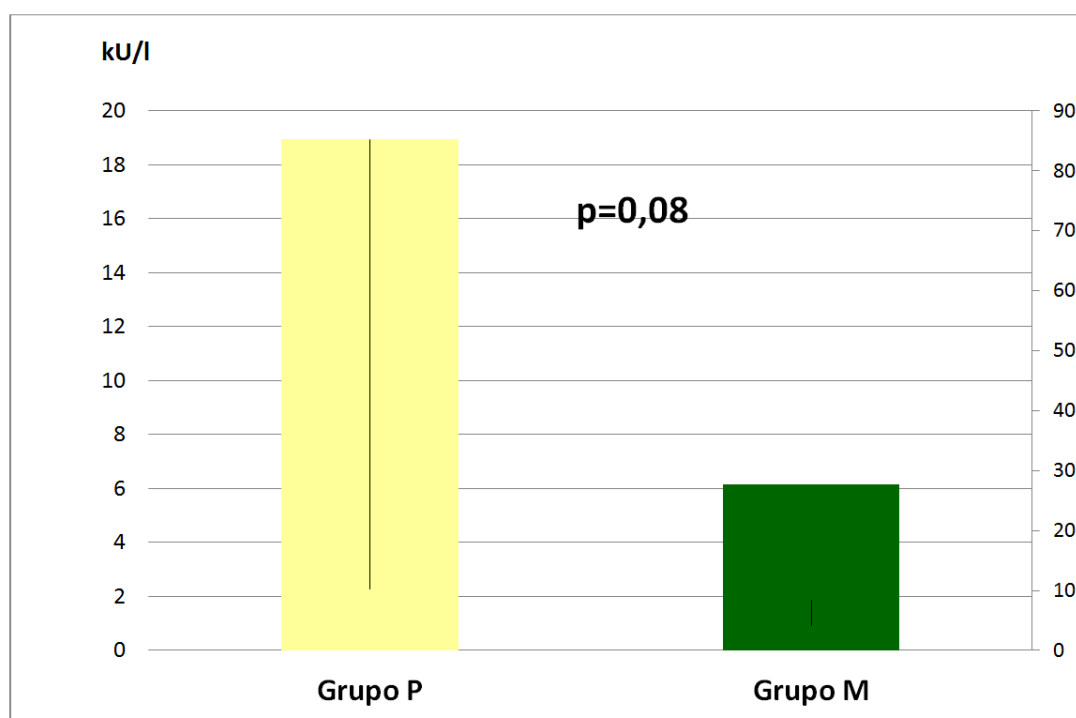


### 7.3. Comparación de resultados de IgE entre los grupos de pacientes P y M

Los resultados de la determinación de IgE específica a gamba, tropomiosina, otros invertebrados y otros mariscos relacionados se analizaron en función de la edad de los pacientes. Dado que la distribución no se aproxima a la normal, los datos que se muestran son la mediana y, entre paréntesis, el cuartil 25 y el cuartil 75.

#### 7.3.1. *IgE específica a gamba*

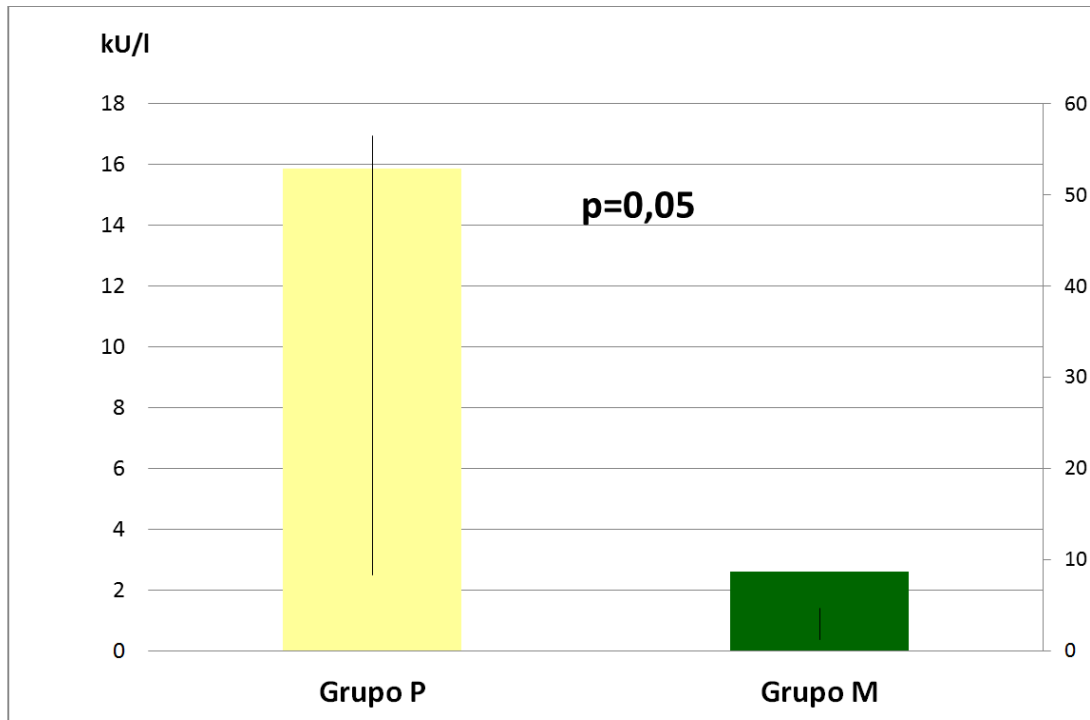
No se observaron diferencias en los valores de IgE específica a gamba, entre población pediátrica y adulta alérgica a gamba. El grupo P obtuvo un resultado de una mediana de 18,95 kU/l (10,26-85,12) y el grupo M de una mediana de 6,15 uK/l (4,16-8,29) ( $p=0,08$ ). Figura 27.



**Figura 27.** Resultados de los valores de IgE específica a gamba según la edad en los pacientes con PODCCP positiva según edad. Grupo P: Pacientes pediátricos. Grupo M: Pacientes adultos.

### 7.3.2. IgE específica a tropomiosina

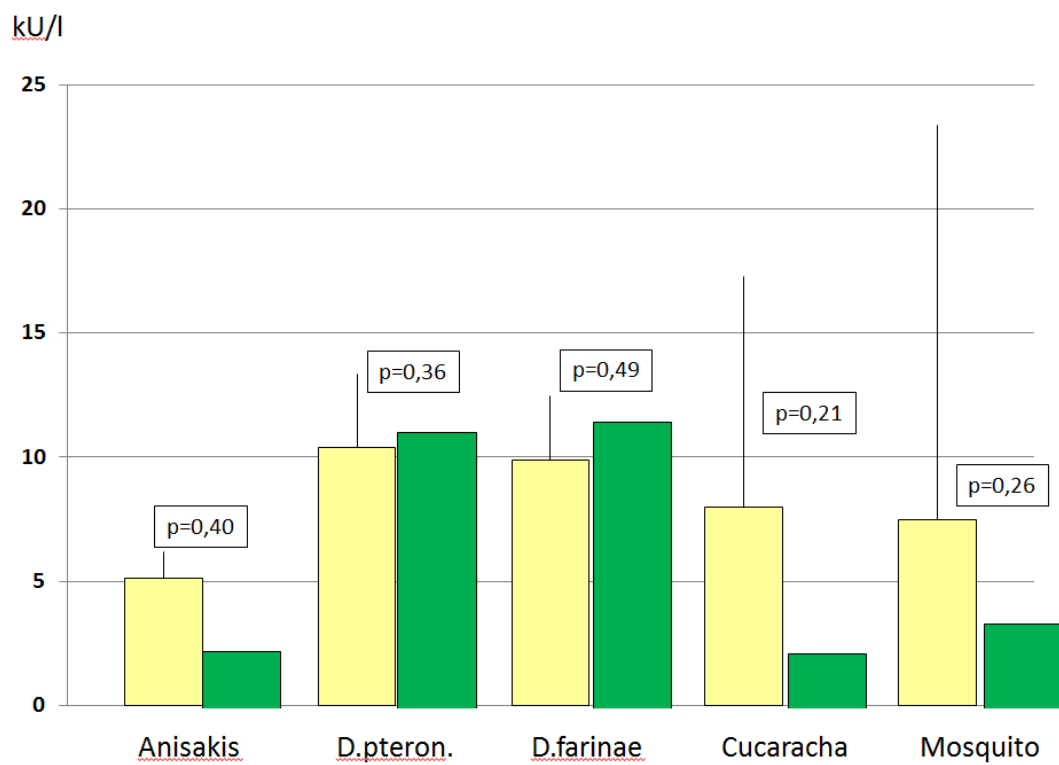
La IgE específica a tropomiosina fue superior en los pacientes del grupo P que en el grupo M. Esta diferencia ha sido pequeña, pero aún significativa ( $p=0,05$ ) fue observada entre los pacientes pediátricos 15,85 kU/l (8,26-56,42) y los adultos 2,60 kU/l (1,24-4,71) que presentaban PODCCP positiva. Figura 28.



**Figura 28.** Resultados de los valores de IgE específica a tropomiosina según la edad en los pacientes con PODCCP positiva según edad. Grupo P: Pacientes pediátricos. Grupo M: Pacientes adultos.

### 7.3.3. IgE específica a otros invertebrados

No se observan diferencias entre los valores de IgE específica a otros invertebrados, entre población adulta y población infantil. Los resultados se muestran la Figura 29 y en la Tabla XIII.



**Figura 29.** Comparación de niveles de IgE específica a invertebrados (mediana) entre pacientes alérgicos a gamba en función de la edad. Diferencias entre el grupo P (en amarillo) y pacientes del grupo M (en verde).

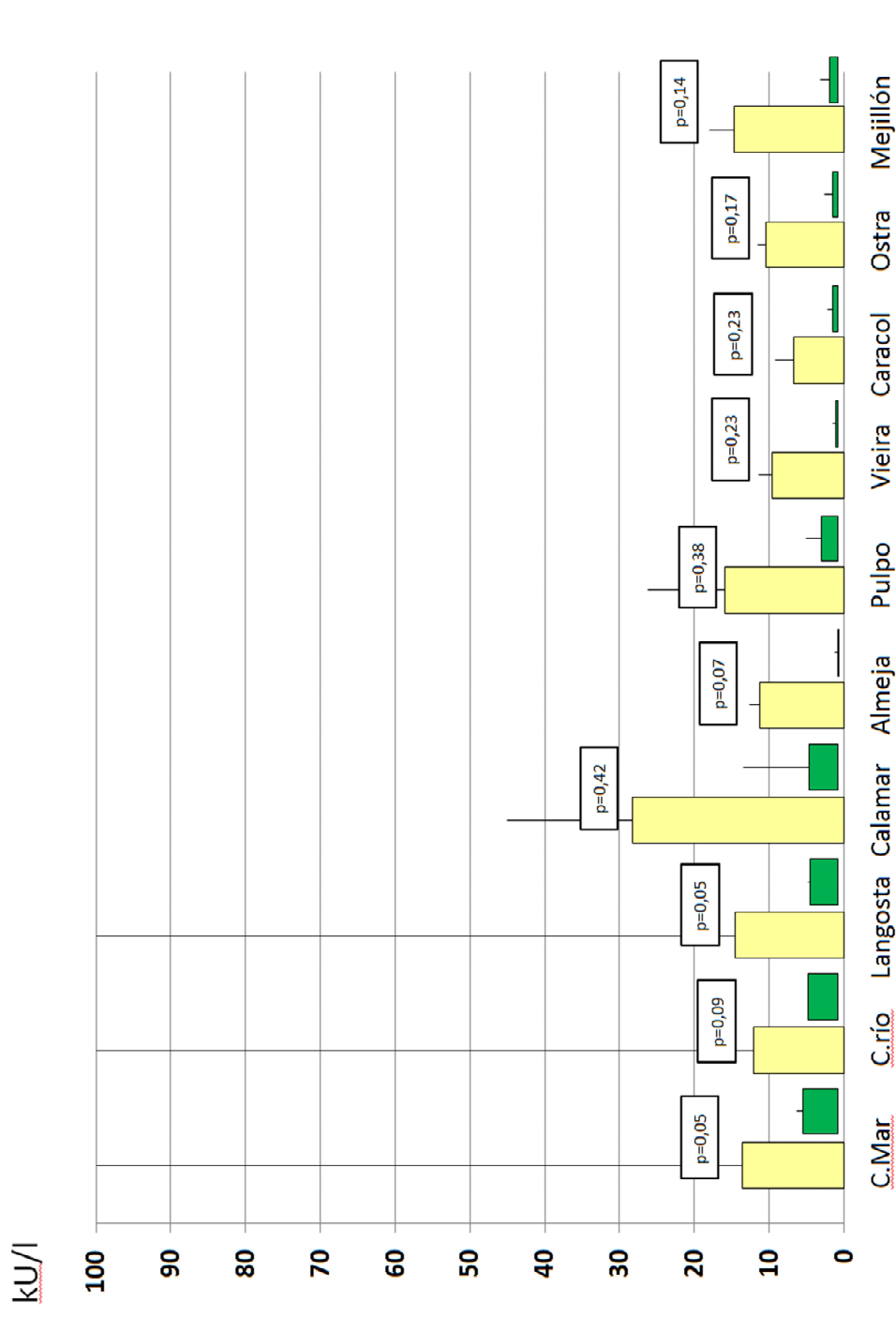
**Tabla XIII. Valores de IgE específica de los pacientes con PODCCP positiva, según edad**

		Grupo P (N=10)		Grupo M (N=7)		p
		kU/l	%	kU/l	%	
Invertebrados	Anisakis	1,88 (0,71-6,17)	100	1,00 (0,10-2,27)	71,42	0,4009
	D. pteronys.	10,40 (3,05-13,35)	100	1,79 (0,95-10,99)	85,71	0,3676
	D. farinae	9,88 (3,27-12,45)	100	2,70 (1,07-11,40)	85,71	0,4923
	Cucaracha	7,96 (2,42-17,28)	100	1,82 (1,46-2,19)	85,71	0,2198
	Mosquito	7,46 (2,52-23,35)	100	2,40 (1,73-3,36)	85,71	0,2635
	Gamba	18,95 (10,26-85,12)	100	6,15 (4,16-8,29)	100	0,0869
	Tropomiosina	15,85 (8,26-56,42)	100	2,60 (1,24-4,71)	85,71	<b>0,0508</b>
Otros mariscos	Cangrejo mar	13,60 (7,70-100)	100	4,78 (2,95-5,52)	100	0,0593
	Cangrejo río	12,00 (5,93-100)	100	3,97 (3,62-3,99)	100	0,0907
	Langosta	14,50 (9,67-100)	100	3,74 (3,04-4,03)	100	0,0593
	Calamar	28,25 (3,14-45,05)	100	3,89 (2,52-12,76)	85,71	0,4278
	Almeja	11,20 (1,16-12,65)	100	0,00 (0,00-0,51)	50	0,0747
	Pulpo	15,90 (2,09-26,20)	100	2,18 (1,07-4,34)	85,71	0,3834
	Vieira	9,59 (5,46-11,39)	100	0,36 (0,00-0,77)	66,66	0,2302
	Caracol	6,66 (1,43-9,17)	100	0,78 (0,12-1,43)	71,42	0,2343
	Ostra	10,40 (1,59-11,50)	100	0,74 (0,47-1,76)	85,71	0,1775
	Mejillón	14,70 (2,29-18,03)	100	1,12 (0,17-2,36)	71,42	0,1425

Se muestra el resultado en mediana de kU/l, entre paréntesis los cuartiles. El porcentaje de pacientes se refiere a aquéllos con IgE específica >0,35 kU/l.

### 7.3.4. IgE específica a otros mariscos

Los resultados de la comparación de las medianas de IgE específica, se muestran en la Figura 30.



**Figura 30.** Comparación de los valores de IgE específica (mediana) a mariscos entre pacientes con PODCCP positiva en función de la edad. Se muestra el grupo P (en amarillo) y el grupo M (en verde).

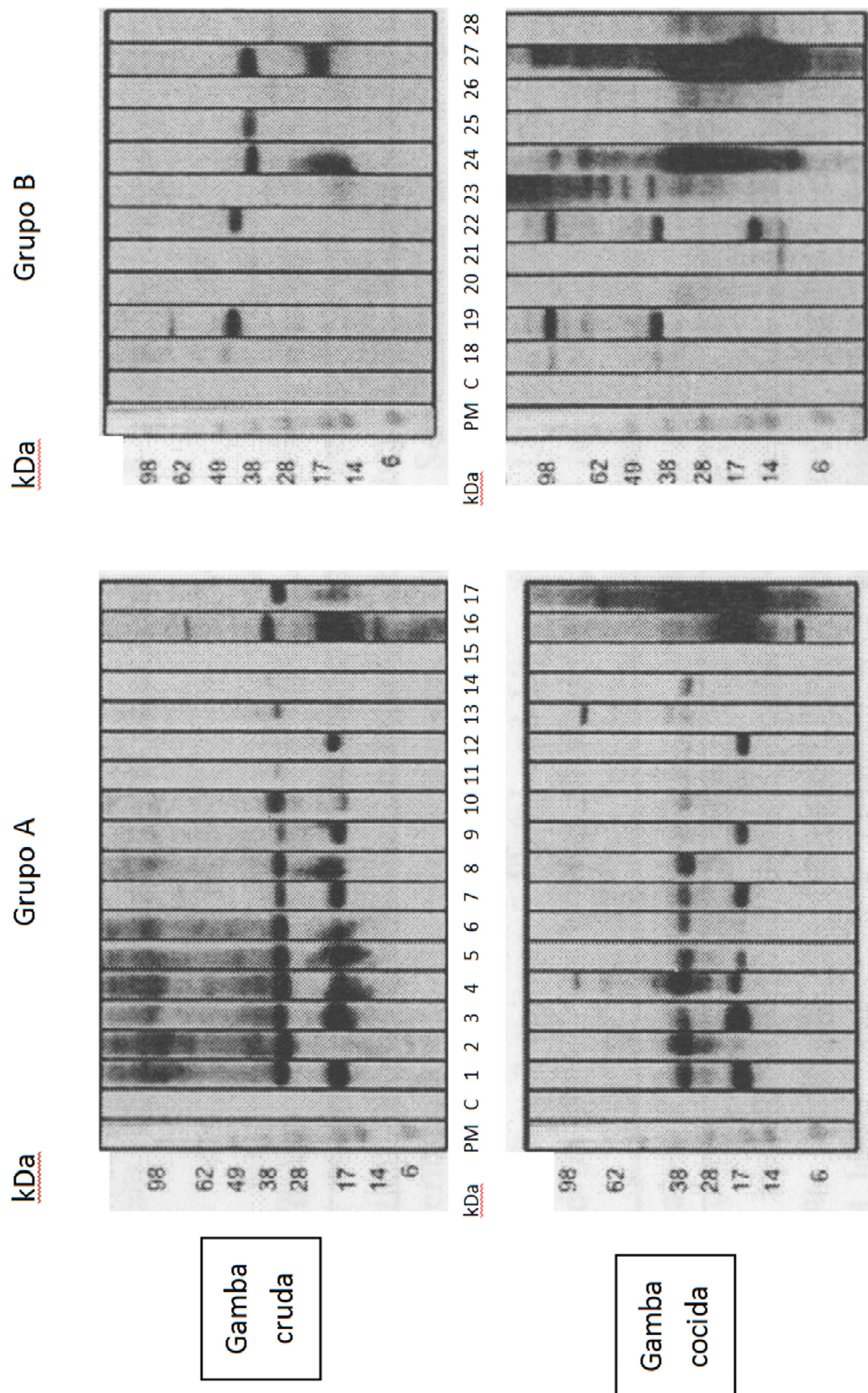
## 8. Electroforesis e inmunotransferencia

### 8.1. Electroforesis unidimensional e inmunotransferencia con gamba cruda y cocida

Para realizar el inmunoblotting con extracto completo de gamba, tanto cruda como cocida, se utilizó el suero de 28 pacientes que participaron en el estudio. De ellos, 17 pertenecían al grupo A (PODCCP con gamba positiva) y 11 al grupo B (PODCCO con gamba negativa).

Los pacientes del grupo A presentaron mayor intensidad en el reconocimiento de IgE mediante inmunoblotting que los del grupo B, y además también reconocían mayor cantidad de proteínas. La mayor parte de estos pacientes (22 [78,57%]) mostraron fijación por bandas que abarcaban de 6 a 90 kDa, tanto en extracto de gamba cruda como en extracto de gamba cocida. Fundamentalmente, reconocían dos bandas proteicas fijadoras de IgE, de aproximadamente 20 kDa y 34 kDa. Figura 31.

El patrón de reconocimiento proteico resultó diferente en el grupo B. En general, la fijación fue más débil que en el grupo A. Además, 5 pacientes (45,45%) del grupo B reconocieron la proteína de 34 kDa. Estos mismos pacientes reconocieron también proteínas de alto peso molecular en el extracto de gamba cocida y sólo 3 (27,27%) reconocían la de 20 kDa. Figura 31.



**Figura 31.** Inmunoblotting con extracto completo de gamba cruda y cocida. A: sueros de pacientes del grupo A, B: sueros de pacientes del grupo B. El carril c muestra los controles, no atópicos.

Entre el resto de alérgenos, el que con mayor proporción detectan los pacientes tanto del grupo A como del grupo B es una banda de entre 60 y 80 kDa, concretamente 7 pacientes del grupo A y 5 del grupo B, que podría corresponder con la hemocianina. Hemos observado además que 3 pacientes alérgicos a gamba presentan una banda fijadora de IgE de un peso molecular de aproximadamente 28 kDa y que podría corresponderse con la Troponina C. Esta detección es un hallazgo del extracto de gamba cocida exclusivamente. Además, tres pacientes del grupo A y dos del grupo B detectan una banda de entre 43 y 46 kDa que podría corresponderse a FBPA o  $\beta$ -actina.

También el número de bandas fijadoras de IgE se corresponde con la sintomatología clínica. En el extracto de gamba cruda, hasta 7 pacientes del grupo A detectan tres bandas fijadoras, 6 pacientes 2 bandas y 2 pacientes una banda fijadora. Dos pacientes del grupo A no detectan IgE mediante inmunoblotting. En cambio, la mayor parte del grupo B (5) no detecta ninguna fijación, mientras que 4 pacientes detectan una banda y dos pacientes dos bandas.

Los dos pacientes que detectan dos bandas son, en un caso, una paciente adolescente que detecta tropomiosina y una banda en torno a 60-80 kDa. El otro paciente que detecta dos bandas es un niño menor de 2 años que identifica una banda de 38 kDa y otra de 17-20 kDa.

Dos pacientes alérgicos a gamba no detectan banda de 38 kDa, probablemente tropomiosina. Una de ellas es una paciente que en cambio sí reconoce la Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico y presenta en suero una IgE específica a tropomiosina de 2,6 kU/l. El otro paciente no detecta ninguna banda proteica en el inmunoblotting, sin embargo, presenta una IgE específica a gamba de 2,72 kU/l y a tropomiosina de 0,46 kU/l.

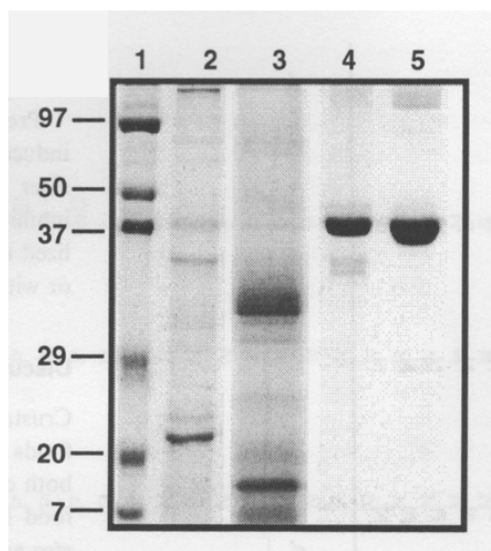
En cambio, 5 pacientes detectan la banda proteica de 38 kDa y, en cambio, no tenían reactividad clínica a gamba. Uno de ellos, detecta, además, la banda fijadora de IgE en torno a 60 y 80 kDa, y otro paciente la de 17-20 kDa.



## 8.2. Electroforesis unidimensional e inmunoblotting con *D.pteronyssinus*, nPen m 1 y rDer p 10

La electroforesis se realizó con extracto completo del ácaro, tropomiosina de gamba y tropomiosina de ácaro y para el inmunoblotting se utilizaron los sueros de 17 pacientes con PODCCP con gamba positiva, 11 pacientes con PODCCP con gamba negativa y los 8 pacientes alérgicos a ácaros.

La electroforesis unidimensional con SDS-PAGE con el extracto completo del ácaro *D.pteronyssinus* mostró varias bandas proteicas con un peso molecular de entre 7 y 97 kDa. El SDS-PAGE con la proteína purificada natural nPen m 1 mostró una banda prominente de 37 kDa, al igual que el recombinante rDer p 10, tal y como se observa en la Figura 32.



Carril 1: Pesos moleculares

Carril 2: Extracto de gamba *S.melanthro*

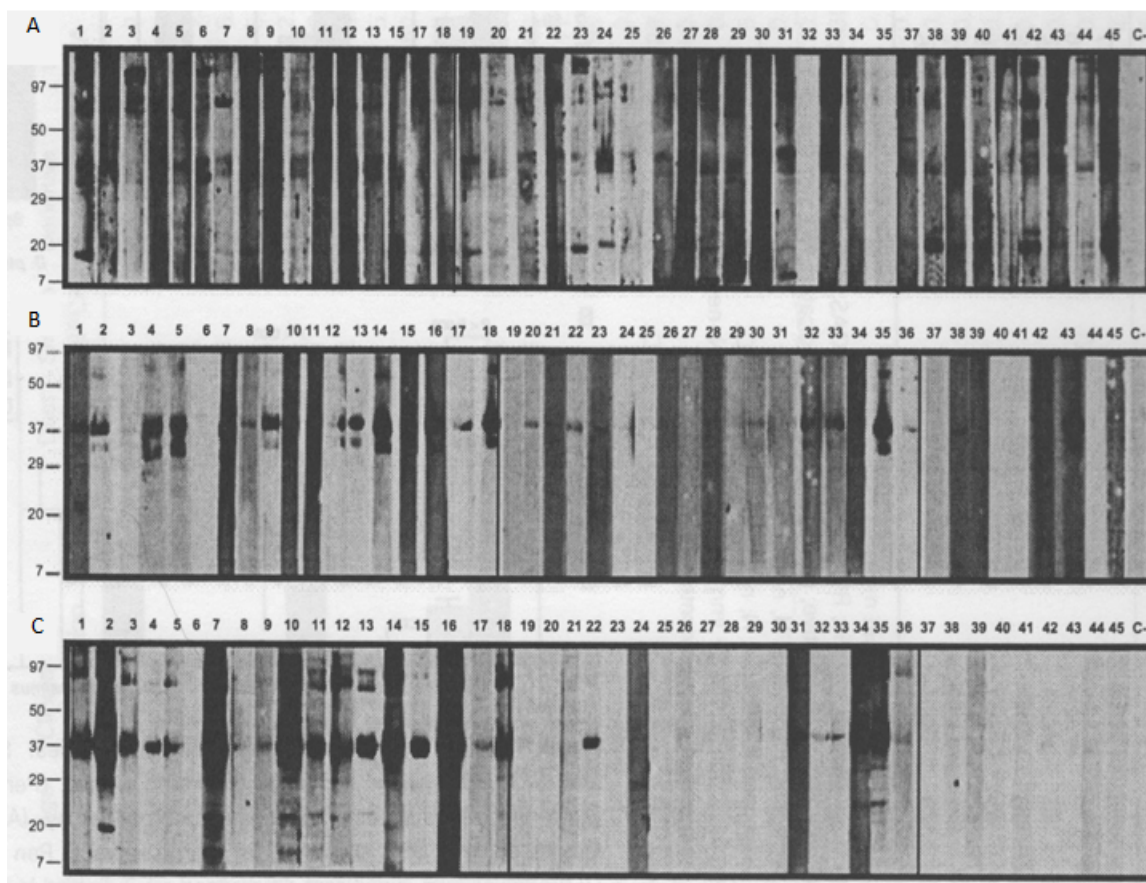
Carril 3: Extracto de *D.pteronyssinus*

Carril 4: Tropomiosina natural purificada de gamba *Penaeus monodon* (Pen m1)

Carril 5: Tropomiosina recombinante purificada de *D. pteronyssinus* (Der p 10)

**Figura 32.** Electroforesis unidimensional -SDS-Page con extracto completo de *D. pteronyssinus*, gamba, tropomiosina de gamba y tropomiosina de ácaro.

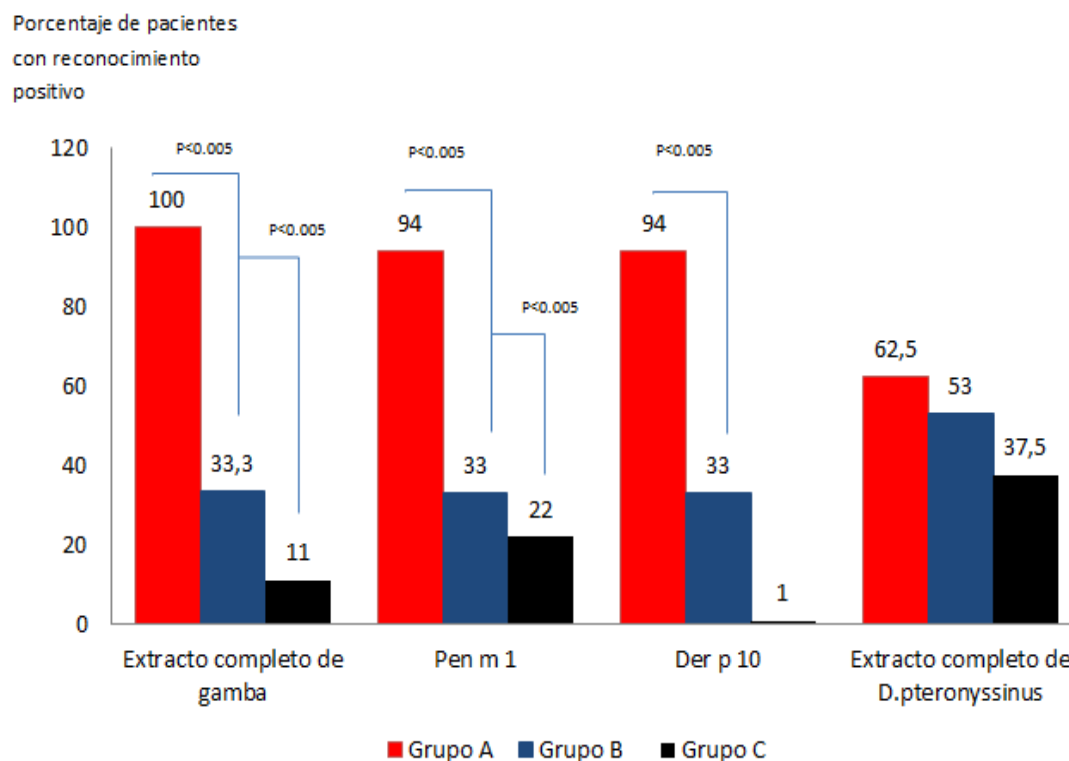
Se realizó un inmunoblotting para evaluar la capacidad fijadora de la IgE del *D. pteronyssinus* (Figura 33A), nPen m 1 (Figura 33B), y rDer p 10 (Figura 33C).



**Figura 33.** Inmunoblotting con extracto completo de *D. pteronyssinus* (A) , con nPen m1 (B) y rDer p10 (C). Los carriles del 1 al 17 pertenecen a los pacientes del grupo A; del 18 al 37 pacientes del grupo B; del 38 al 45 pacientes del grupo C; C- controles no atópicos.

La unión de la IgE al extracto completo de *D. pteronyssinus* fue similar entre todos los grupos. La IgE sérica de los pacientes reconocieron varias proteínas en el extracto de *D. pteronyssinus*: una banda proteica de 20 kDa, que corresponde al alérgeno mayoritario del ácaro de polvo doméstico Der p 2. Esta proteína fue reconocida por los tres grupos. La proteína del *D. pteronyssinus* de en torno a 37–39 kDa, que corresponde con la tropomiosina del ácaro, fue reconocida por 10/16 pacientes del grupo A (62,5%), 9/17 (53%) del grupo B, y 3/8 (37,5%) de los pacientes del grupo C, alérgicos a ácaros. Estos datos no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 34).

Entre los pacientes del grupo A, el 94% mostró una banda fijadora de IgE a nPen m 1 y rDer p 10; mientras que sólo el 33% de los pacientes del grupo B reconocieron nPen m 1 y rDer p 10. En el grupo C de pacientes alérgicos a ácaros, solamente mostraron reactividad a nPen m1 la IgE del 22% de los pacientes, y no se observó ninguna fijación de IgE a rDer p 10 (Figura 34).



**Figura 34.** Diferencias en la fijación de IgE del suero de pacientes de cada grupo a las bandas proteicas de tropomiosina, extracto completo de gamba y D.pteronyssinus.

## 9. Micromatriz

Esta parte del trabajo se realizó en el Pediatric Allergy Department – Jaffe Institute for Food Allergy del Mount Sinai, New York, con la supervisión de los Dres. Rosalía Ayuso y Hugh Sampson.

### 9.1. Identificación epitópica de los alérgenos de gamba: Tropomiosina (Lit v 1), Arginin-kinasa (Lit v 2), Cadena Ligera de la Miosina (Lit v 3) y Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico (Lit v 4)

Para realizar el mapeo epitópico se utilizó suero de 26 de los pacientes reclutados, los 17 del grupo A y 9 pacientes que pertenecían al grupo B. Todos ellos obtuvieron un resultado positivo en inmunoblotting, es decir, que su IgE sérica fijaba al menos una banda proteica. Estos pacientes presentaban una edad comprendida entre los 3 y 48 años, con una media de 16,49 años. Los niveles de IgE específica a gamba estaban entre 0,44 y 100 kU/l, con una mediana de 6,19 kU/l.

La frecuencia de fijación de IgE a las diferentes proteínas, determinada en términos de péptidos de microarray, fue la siguiente: Para Tropomiosina (Lit v 1), 21/26 (80,76%); Cadena Ligera de la Miosina (Lit v 3) 21/26 (80,76%); Arginin kinasa (Lit v 2) 20/26 (76,92%); Proteína ligadora del Calcio Sarcoplásmico (Lit v 4) 13/26 (50%).

La intensidad de fijación de IgE representada por el promedio ponderado de z score fue mayor para los epítomos de Tropomiosina (Lit v 1) y Cadena Ligera de la Miosina (Lit v 3) y menor para Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico (Lit v 4) y Arginin-kinasa (Lit v 2).

Un epítomo ligador de IgE se definió como aquél que contenía al menos dos péptidos contiguos. En algunos casos se observó que la IgE de los pacientes se unía a más de 4 ó 5 péptidos contiguos. Dado que era probable que contuviesen más de un

epítopo, estos péptidos se llamaron región ligadora de IgE. Por ejemplo, los epítomos de tropomiosina 5a, 5b y 5c forman una región ligadora de IgE.

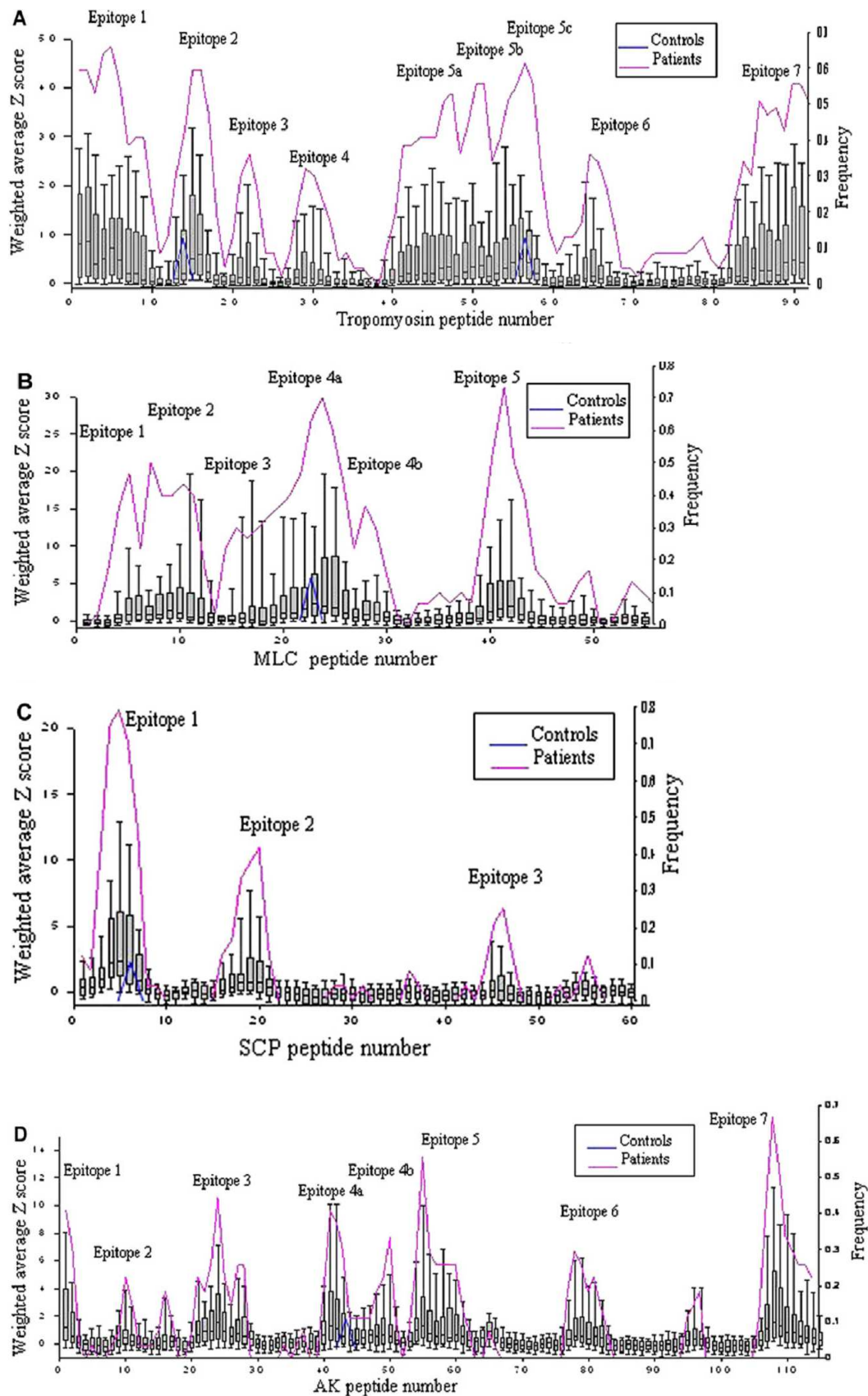
La frecuencia de reconocimiento de cada péptido representa el número de pacientes que reconocen el alérgeno. Se considera que los péptidos representan un epítopo cuando el promedio ponderado de z score es mayor de 3 ( $p < 0,003$ ) ó 2 para la AK ( $p < 0,05$ ) y son reconocidos por al menos el 20% de los pacientes que son positivos para esa determinada proteína.

Los epítomos identificados en cada una de las 4 proteínas y sus frecuencias de reconocimiento (entre los sujetos que reconocen ese alérgeno determinado) están representados en la Tabla XIV.

**Tabla XIV.** Epítomos identificados en la tropomiosina (Lit v 1), MLC (Lit v 3) y SCP (Lit v 4) y AK (Lit v 2), con sus frecuencias de reconocimiento

Tropomiosina									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3	Epitopo 4	Epitopo 5a	Epitopo 5b	Epitopo 5c	Epitopo 6	Epitopo 7
Frecuencia	65%	60%	35%	30%	50%	55%	60%	35%	50%
AA	1-36	37-63	61-81	82-105	115-150	142-162	157-183	190-210	246-284
MLC									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3	Epitopo 4a	Epitopo 4b	Epitopo 5			
Frecuencia	45%	50%	30%	70%	35%	75%			
AA	13-30	22-48	49-66	58-90	79-99	118-141			
SCP									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3						
Frecuencia	80%	40%	25%						
AA	10-36	49-72	130-147						
AK									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3	Epitopo 4a	Epitopo 4b	Epitopo 5	Epitopo 6	Epitopo 7	
Frecuencia	45%	25%	50%	40%	30%	60%	30%	70%	
AA	1-18	25-42	64-96	121-141	142-159	160-192	232-255	319-342	

Teniendo en cuenta la tropomiosina, se identificaron 7 epítomos: 4 de ellos corresponden a los epítomos ya identificados previamente, y 3 fueron identificados de novo. Los nuevos epítomos de Tropomiosina incluyeron los epítomos 1, 3, 5b y 5c. La Cadena Ligera de la Miosina (MLC) presentó 5 epítomos, la Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico (SCP) tenía 3 epítomos y Arginin kinasa (AK) presentó 7 epítomos, que se muestran en la Figura 35.



**Figura 35.** Análisis por Tile-map e identificación de epítomos fijadores de IgE en A:Tropomiosina, B:Cadena Ligera de la Miosina, C:Proteína ligadora del Calcio Sarcoplásmico



y D: Arginin kinasa. Los péptidos se muestran en el eje X. El eje Y muestra la intensidad de fluorescencia de cada péptido (media ponderada Z-score). El eje Y de la derecha muestra la frecuencia de reconocimiento de cada péptido.

Los péptidos con diferencias estadísticamente significativas (valor  $q < 0,03$ ) entre pacientes y sujetos controles no atópicos, se determinaron mediante el test de Wilcoxon y ajuste FDR, como se muestra en la Figura 36.

<b>Tp-001#</b>	mdaikkkmqamklek	MLC-001	rksgsrssksrsk	SCP-001	mayswdrnrkyvrvy	AK-001#	madaaviekleagfk
<b>Tp-002#</b>	ikkkmqamklekdna	MLC-002	ksgsrssksrsksg	SCP-002	swdrnrkyvrvymyd	AK-002#	aaviekleagfkkle
<b>Tp-003#</b>	kmqamklekdnamdr	MLC-003	srssksrsksgsgs	SCP-003	nrkyvrvymydidn	AK-003#	iekleagfkkleaat
<b>Tp-004#</b>	amklekdnamdradt	MLC-004	ssksrsksgsgsnvf	SCP-004#	kyvrvymydidnngf	AK-004#	leagfkkleaatdck
<b>Tp-005#</b>	lekdnamdradtleg	<b>MLC-005#</b>	<b>rskksrgsgsnvdfmf</b>	<b>SCP-005#</b>	<b>vrymydidnngfldk</b>	AK-005	gfkkleaatdcksl
<b>Tp-006#</b>	dnamdradtlegqnk	<b>MLC-006#</b>	<b>ksgsgsnvdfmftqr</b>	<b>SCP-006#</b>	<b>mydidnngfldkndf</b>	AK-006	kleaatdckslkky
<b>Tp-007#</b>	mdradtlegqnkean	<b>MLC-007#</b>	<b>gsgsnvdfmftqrqva</b>	<b>SCP-007#</b>	<b>idnngfldkndfcl</b>	AK-007	aatdckslkkyltk
<b>Tp-008#</b>	adtlegqnkeannra	<b>MLC-008#</b>	<b>nvdfmftqrqvaefk</b>	SCP-008#	ngfldkndfclavr	AK-008#	dckslkkytkvevf
<b>Tp-009</b>	leqqnkeannraeks	<b>MLC-009#</b>	<b>dmftqrqvaefkegf</b>	SCP-009	ldkndfclavrnlt	AK-009#	slkkytkvevfkl
<b>Tp-010</b>	qnkeannraekseee	<b>MLC-010#</b>	<b>tqrqvaefkegfglm</b>	SCP-010	ndfclavrnltieg	AK-010#	kkyltkevfdkldk
<b>Tp-011</b>	eannraekseeevhn	<b>MLC-011#</b>	<b>qvaefkegfglmdrd</b>	SCP-011	eclavrnltiegge	AK-011	ltkevfdkldkdkts
<b>Tp-012</b>	nraekseeevhnqk	<b>MLC-012#</b>	<b>efkegfglmdrdkdq</b>	SCP-012	avrnltieggefsa	AK-012	evfdkldkdktslga
<b>Tp-013#</b>	ekseeevhnqkrmq	<b>MLC-013#</b>	<b>egfglmdrdkdqvgig</b>	SCP-013#	ntlieggefsaday	AK-013	dkldkdktslgatl
<b>Tp-014#</b>	eeevhnqkrmqqle	MLC-014#	qlmdrdkdqvgigkt	SCP-014#	iegefsadayann	AK-014	kdkdktslgatlldi
<b>Tp-015#</b>	<b>vhnlqkrmqqleldl</b>	MLC-015	drdkdvgigktldrg	SCP-015#	rgefsadayannqki	AK-015#	ktsgatlldivqsg
<b>Tp-016#</b>	<b>lqkrmqqleldldqv</b>	<b>MLC-016</b>	<b>kdvgigktldrgtfd</b>	<b>SCP-016#</b>	<b>fsadayannqkimrn</b>	AK-016#	lgatlldivqsgven
<b>Tp-017#</b>	<b>rmqqleldldqvqes</b>	<b>MLC-017#</b>	<b>vigktldrgtfdieg</b>	<b>SCP-017#</b>	<b>dayannqkimrnlnw</b>	AK-017#	tlldivqsgvenlds
<b>Tp-018#</b>	qlendldqvqesllk	<b>MLC-018#</b>	<b>ktldrgtfdiegria</b>	<b>SCP-018</b>	<b>annqkimrnlnwneia</b>	AK-018	divqsgvenldsgvg
<b>Tp-019#</b>	ndldqvqesllkani	<b>MLC-019#</b>	<b>lrgtfdiegriatdq</b>	<b>SCP-019</b>	<b>qkimrnlnwneiaela</b>	AK-019	qsgvenldsgvgiya
<b>Tp-020#</b>	dqvqesllkaniqlv	<b>MLC-020#</b>	<b>tfdeigriatdqeld</b>	<b>SCP-020#</b>	<b>mrnlwneiaeladfn</b>	AK-020	venldsgvgiyapda
<b>Tp-021#</b>	qesllkaniqlvekd	<b>MLC-021#</b>	<b>eigriatdqeldeml</b>	SCP-021	lnwneiaeladfnkdq	AK-021	ldsgvgiyapdaaey
<b>Tp-022#</b>	llkaniqlvekdka	<b>MLC-022#</b>	<b>riatdqeldemlada</b>	SCP-022	eiaeladfnkdgevt	AK-022#	gvgiyapdaaeytlf
<b>Tp-023#</b>	aniqlvekdkaalsna	<b>MLC-023#</b>	<b>tdqeldemladapap</b>	SCP-023	eladfnkdgevtvde	AK-023#	iyapdaaeytlfap
<b>Tp-024</b>	qlvekdkaalsnaege	<b>MLC-024#</b>	<b>eidemladapapinf</b>	SCP-024	dfnkdgevtvdefkq	AK-024#	pdaaeytlfapldp
<b>Tp-025</b>	ekdkalsnaegevaa	<b>MLC-025#</b>	<b>emladapapinfmli</b>	SCP-025	kdgevtvdefknaava	AK-025#	eaaytlfapldnaie
<b>Tp-026</b>	kalsnaegevaaln	<b>MLC-026#</b>	<b>adapapinfmli</b>	SCP-026	evtvdfeqavqkchc	AK-026	tlfapldpiiedyh
<b>Tp-027</b>	snaegevaalnriq	MLC-027#	papinfmli	<b>SCP-027</b>	vdefkqavqkchcggk	AK-027#	apldpiiedyhgvgf
<b>Tp-028#</b>	<b>egevaalnriqle</b>	MLC-028#	<b>infmli</b>	<b>SCP-028</b>	<b>fkqavqkchcggkkyg</b>	AK-028#	<b>fdpiiedyhgvgfkt</b>
<b>Tp-029#</b>	<b>vaalnriqleed</b>	MLC-029#	<b>tmli</b>	<b>SCP-029</b>	<b>avqkchcggkkygdfp</b>	AK-0293	<b>iiedyhgvgfktqdkh</b>
<b>Tp-030#</b>	<b>lnriqleeders</b>	<b>MLC-030</b>	<b>lnmfaerqtgesdd</b>	<b>SCP-030</b>	<b>khcggkkygdfpgaf</b>	AK-030	<b>dhyhgvgfktqdkhpnk</b>
<b>Tp-031#</b>	<b>riqleedlerseer</b>	<b>MLC-031</b>	<b>faerqtgesdddv</b>	SCP-031	qgkkygdfpgafkvf	AK-031	vgfktqdkhpnkdfg
<b>Tp-032#</b>	lleedlerseerInt	<b>MLC-032</b>	<b>rqtesdddv</b>	SCP-032	kygdfpgafkvfian	AK-032	kqtdkhpndkfddv
<b>Tp-033#</b>	edlerseerIntatt	<b>MLC-033</b>	<b>gesdddv</b>	SCP-033	dfpgafkvfianqfk	AK-033#	dkhpnkdfgdvnsfv
<b>Tp-034</b>	erseerIntattkla	MLC-034	dddvakafafad	SCP-034	gafkvfianqfkaid	AK-034#	pnkdfgdvnsfvnd
<b>Tp-035</b>	eerIntattklaeas	MLC-035	dvakafafadeeg	<b>SCP-035</b>	<b>kvfianqfkaidvng</b>	AK-035	<b>dfgdvnsfvndpeg</b>
<b>Tp-036</b>	Intattklaeasqaa	MLC-036	akafafadeegnid	<b>SCP-036</b>	<b>ianqfkaidvngdgk</b>	AK-036	<b>dvnsfvndpegkfv</b>
<b>Tp-037</b>	attklaeasqaades	MLC-037	flafadeegniddct	<b>SCP-037</b>	<b>qfkaidvngdgkvgl</b>	AK-037	<b>sfvndpegkfvist</b>
<b>Tp-038</b>	klaeasqaadeserm	<b>MLC-038</b>	<b>fadeegniddctfrh</b>	SCP-038	aidvngdgkvgldey	AK-038	nvdpegkfvistrr
<b>Tp-039#</b>	eaasqaadesermkv	<b>MLC-039</b>	<b>eegniddctfrhalm</b>	SCP-039	vngdgkvgldeyrl	AK-039	pegkfvistrrvgr
<b>Tp-040#</b>	qaadesermkvlen	<b>MLC-040#</b>	<b>niddctfrhalm</b>	SCP-040	dgkvgldeyrlcit	AK-040	kfvistrrvgrsmq
<b>Tp-041#</b>	desermkvlenrsl	<b>MLC-041#</b>	<b>cdtfrhalm</b>	SCP-041	vgldeyrlcitrsa	<b>AK-041</b>	<b>istrrvgrsmqgyp</b>
<b>Tp-042#</b>	ermkvlenrslsde	<b>MLC-042#</b>	<b>frhalm</b>	SCP-042	deyrlcitrsafae	<b>AK-042</b>	<b>rvrcgrsmqgypfnc</b>
<b>Tp-043#</b>	kvlenrslsdeerm	<b>MLC-043#</b>	<b>almtwgdkfssqead</b>	SCP-043	rlldcitrsafae	<b>AK-043</b>	<b>cgsmqgypfncpct</b>
<b>Tp-044#</b>	lenrslsdeermal	MLC-044	twgdkfssqeadal	<b>SCP-044</b>	<b>citrsafae</b>	<b>AK-044</b>	<b>smqgypfncpctesq</b>
<b>Tp-045#</b>	<b>rlsdeermaleng</b>	MLC-045	dkfssqeadaldqm	<b>SCP-045</b>	<b>rsafae</b>	AK-045	gypfncpctesqyke
<b>Tp-046#</b>	sdeermalenglke	MLC-046	ssqeadaldqmdid	<b>SCP-046</b>	<b>faevkeiddaynkl</b>	AK-046#	fncpctesqykemea
<b>Tp-047#</b>	ermalenglkearf	MLC-047	eaddaldqmdiddg	<b>SCP-047</b>	<b>vkeiddaynklittd</b>	AK-047#	ctesqykemeakvs
<b>Tp-048#</b>	dalenqlkearfiae	MLC-048	daldqmdiddgkid	SCP-048	iddaynklittdrkl	AK-048#	esqykemeakvsstl

## Resultados

<b>Tp-049#</b>	enqlkearflaeead	MLC-049	dqmdiddggkidvqg	SCP-049	aynkltteddrkagg	AK-049#	ykemeakvsstlssl
<b>Tp-050#</b>	lkearflaeeadrky	MLC-050	diddggkidvqgviq	SCP-050	kltteddrkaggltl	<b>AK-050</b>	meakvsstlsslge
<b>Tp-051#</b>	arflaeeadrkydev	MLC-051	dggkidvqgviqmit	SCP-051	teddrkaggltlery	<b>AK-051</b>	kvsstlsslgekg
Tp-052#	laeeadrkydevark	MLC-052	kidvqgviqmitagg	SCP-052	drkaggltleryqdl	AK-052	stlsslgekgtyy
Tp-053#	eadrkydevarklam	MLC-053#	vqgviqmitaggdd	SCP-053	aggltleryqdlyaq	AK-053	sslegelkgtyyplt
Tp-054#	rkydevarklamvea	MLC-054#	viqmitaggddaaa	SCP-054	ltleryqdlyaqfis	AK-054#	egelkgtyypltgms
Tp-055#	devarklamveadle	MLC-055	mltagggddaaaaa	SCP-055	eryqdlyaqfisnpsd	AK-055#	lkgtyypltgmskev
<b>Tp-056#</b>	arklamveadlerae			SCP-056	qdlyaqfisnpsdesc	AK-056#	tyypltgmskevqqk
<b>Tp-057#</b>	lamveadleraeera			SCP-057	yaqfisnpsdescsac	AK-057#	pltgmskevqqklid
Tp-058	veadleraeeraetg			SCP-058	fisnpsdescsacylf	AK-058#	gmskevqqklidhdf
Tp-059	dleraeraetgesk			SCP-059	npdescsacylfgpl	AK-059#	kevqqklidhflfk
Tp-060	raeraetgeskive			SCP-060	escsacylfgplkv	AK-060#	qqklidhflfkged
Tp-061	eraetgeskivelee					AK-061#	liddhflfkgedrfl
Tp-062	etgeskiveleelr					AK-062#	dhflfkgedrflqaa
Tp-063#	eskiveleelrvvg					AK-063	lfkgedrflqaanac
Tp-064#	iveleelrvvgnnl					AK-064	egdrflqaanacryw
Tp-065#	leelrvvgnnlksl					AK-065#	rflqaanacrywpag
Tp-066#	elrvvgnnlkslevs					AK-066#	qaanacrywpagrgi
Tp-067#	vgnnlkslevseek					AK-067	nacrywpagrgiyhn
<b>Tp-068#</b>	nnlkslevseekanq					AK-068	rywpagrgiyhndnk
<b>Tp-069</b>	kslevseekanqree					AK-069	pagrgiyhndnkftl
Tp-070#	evseekanqreeayk					AK-070	rgiyhndnkftflvv
Tp-071#	eeekanqreeaykeqi					AK-071	yhndnkftflvvnee
Tp-072#	anqreeaykeqiktl					AK-072	dnkftflvvneedhl
Tp-073	reeaykeqiktltnk					AK-073#	tflvvneedhlrii
Tp-074#	aykeqiktltnklka					AK-074#	vvvneedhlriismq
Tp-075#	eqiktltnklkaaea					AK-075	needhlriismqmgg
Tp-076#	ktltnklkaaeaeae					AK-076	dhliismqmggdldg
Tp-077#	tnklkaaeaeaeae					AK-077	riismqmggdldgvf
<b>Tp-078#</b>	lkaaeaeaeafaersv					<b>AK-078</b>	smqmggdldgvfrl
<b>Tp-079#</b>	aeaeaeafaersvqkl					<b>AK-079#</b>	mggdldgvfrltsa
<b>Tp-080</b>	raefaersvqklqke					AK-080#	dldgvfrltsavne
<b>Tp-081</b>	faersvqklqkevdr					<b>AK-081#</b>	qvfrltsavneiek
<b>Tp-082</b>	rsvqklqkevdrled					<b>AK-082</b>	rrltsavneiekrip
<b>Tp-083#</b>	qklqkevdrledelv					AK-083	tsavneiekripfsh
<b>Tp-084#</b>	qkevdrledelvnek					AK-084	vneiekripfshhdr
Tp-085#	vdredelvnekeky					AK-085	iekripfshhdrigf
Tp-086#	ledelvnekekyksi					AK-086	ripfshhdrigfltf
<b>Tp-087#</b>	elvnekekyksitde					AK-087	fshhdrigfltfcpt
<b>Tp-088#</b>	nekekyksitdeldq					AK-088	hdrigfltfcptnlg
<b>Tp-089#</b>	ekyksitdeldqtfs					AK-089	lgfltfcptnlgttv
<b>Tp-090#</b>	ksitdeldqtfsels					AK-090	ltfcptnlgttvras
<b>Tp-091#</b>	tdeldqtfselsgy					AK-091	cptnlgttvrasvhi
						AK-092	nlgttvasvhihklp
						AK-093	ttvasvhihklpkl
						AK-094	rasvhihklpklaanr
						AK-095#	vhiklpklaanrekl
						AK-096#	klpklaanrekleev
						AK-097#	klaanrekleevagk
						AK-098	anrekleevagkynl
						AK-099	ekleevagkynlqvr
						AK-100	eevagkynlqvrgrtr
						AK-101	agkynlqvrgrtrgeh
						AK-102	ynlqvrgrtrgehea
						AK-103	qvrgrtrgeheaegg
						AK-104	gtrgeheaeggidy
						AK-105	geheaeggidydisn
						AK-106	teaeggidydisnrr
						AK-107#	eggidydisnrrmgl
						AK-108#	iydisnrrmgltef
						AK-109#	isnrrmgltefqav
						AK-110#	krrmgltefqavkem
						AK-111#	mglttefqavkemqdg
						AK-112#	tefqavkemqdgile
						AK-113#	qavkemqdgilelik
						AK-114#	kemqdgilelikiek
						AK-115	qdgilelikiekem

**Figura 36.** Secuencia de aminoácidos y epítomos de cada una de las cuatro proteínas alergénicas (se muestran resultados parciales). Los péptidos identificados en cada una de las



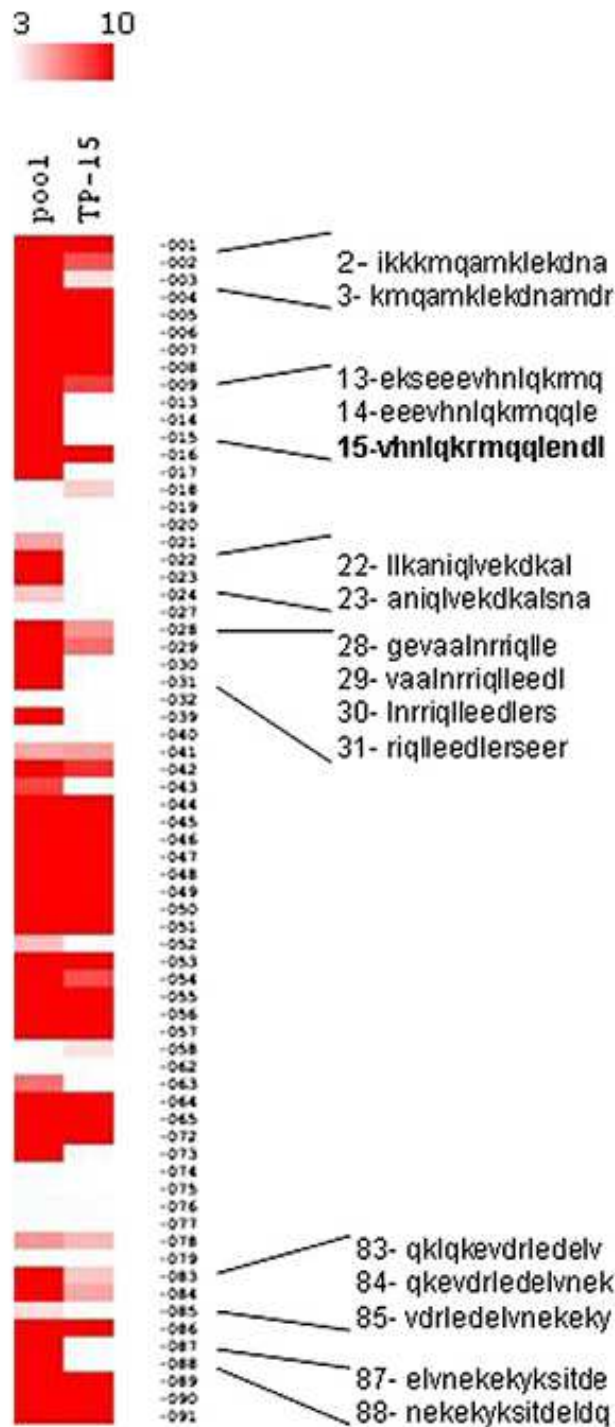
cuatro proteínas se muestran en amarillo. Los epítomos de tropomiosina (Tp, en la figura) que habían sido previamente identificados, antes de este trabajo, se muestran encuadrados. Los péptidos de cada una de las 4 proteínas con diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y el grupo control, tras ajuste FDR, se muestran con el símbolo # junto al número del péptido.

## 9.2. Estudios de inhibición

Los experimentos de inhibición se realizaron con péptidos seleccionados como inhibidores para demostrar que la señal fluorescente emitida por el punto del péptido era específica, es decir, mediada por IgE. Para cada proteína, se seleccionaron 1 ó 2 péptidos que se unían a los anticuerpos IgE del sujeto y fueron señalados como un epítomo ligador de IgE.

Se obtuvo, según lo esperado, la inhibición de los péptidos ligadores de IgE a la secuencia idéntica que se encontraba impresa en la placa de cristal, así como también fueron inhibidos los péptidos adyacentes. Este último hecho también es congruente, puesto que cada péptido se solapa con los péptidos adyacentes en 12 ó 15 aminoácidos.

En el caso de la tropomiosina, el péptido 15 (epítomo 2: VHNLQKRMQQLENDL) inhibió no solamente la misma secuencia incluida en péptidos 13 a 15 (epítomo 2: VHNLQKRMQQLENDLDQVQES) sino también los péptidos 2 a 3 (epítomo 1: IKKKMQAMKLEKDNAMDR), péptidos 29 a 31 (epítomo 4: VAALNRRIQLLEEDLERSEER) y péptidos 84 a 85 (epítomo 7: QKLQKEVDRLEDELVNEK). Figura 37.



**Figura 37.** Inhibición de péptidos de tropomiosina. En filas se muestran los péptidos (1-91). En la columna de la izquierda, los péptidos reconocidos por una muestra de 5 pacientes alérgicos a gamba. En la columna de la derecha, reactividad de los mismos péptidos tras preincubación con el péptido 15 de tropomiosina (TP-15). La intensidad de reconocimiento se muestra en un rango que comprende desde una media ponderada de z score <3 (se muestra en blanco) a z score >10 (en rojo).

**9.3. Relación del mapa epitópico según la expresividad clínica: comparación entre los grupos A (PODCCP positiva) y B (PODCCP negativa).**

El mapeo epitópico se realizó en el suero de 15 de los 17 pacientes del grupo A y en 11 pacientes del grupo B.

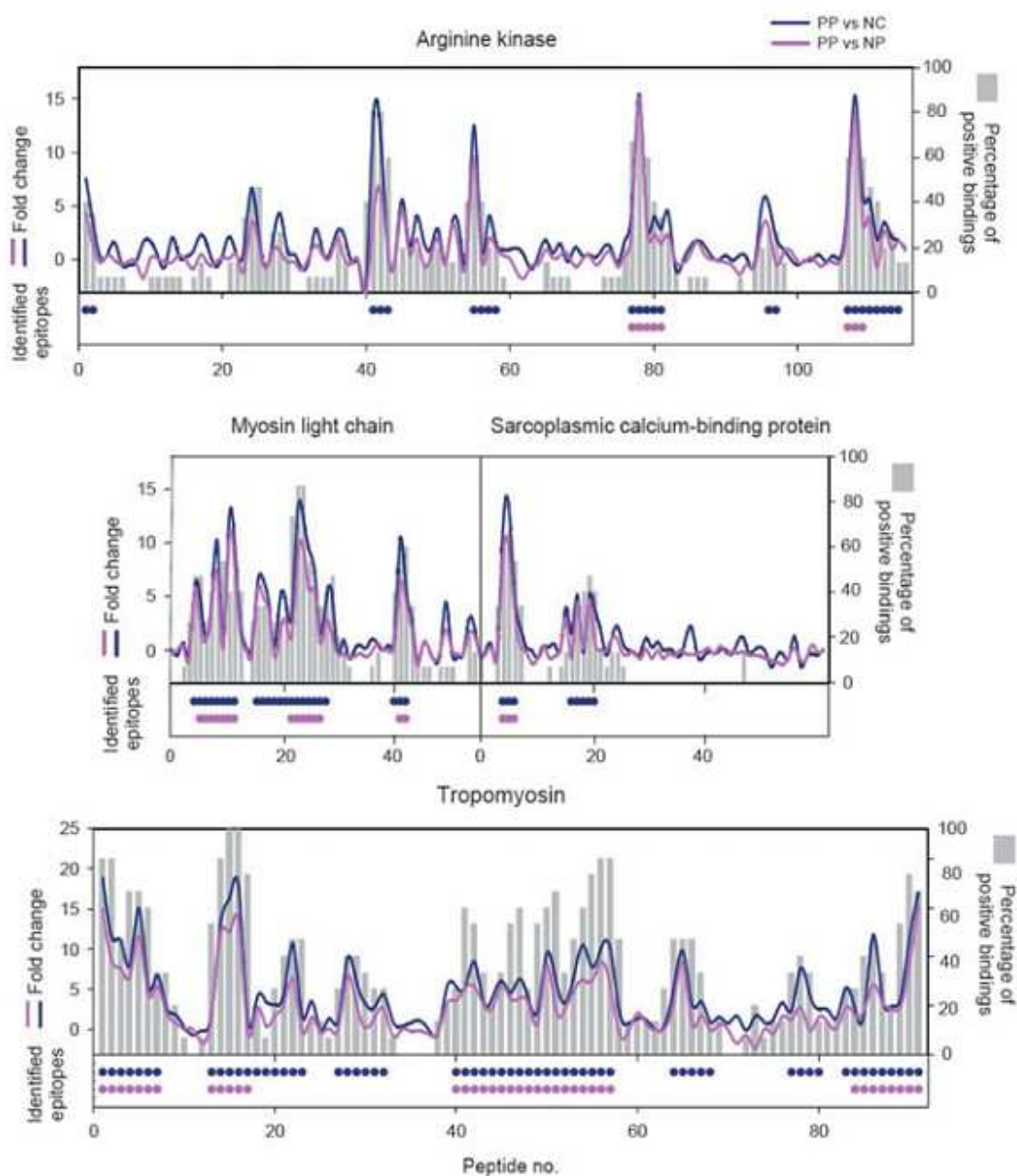
Los criterios de selección para la realización del mapeo epitópico se realizó por disponibilidad de suero y mayor probabilidad de detección de epítomos fijadores de IgE, siguiendo los resultados clínicos, y el resultado preliminar de otras pruebas in vitro, tales como IgE específica o inmunoblotting.

Los epítomos mayores de IgE descritos para Lit v 1, Lit v 2, Lit v 3 y Lit v 4 fueron los que se muestran en las Figuras 36 y 37, según frecuencias de reconocimiento e intensidad en la Tabla XV. La frecuencia de reconocimiento de cada epítomo para cada proteína representa el número de pacientes que reconocen cada epítomo dividido entre el número total de pacientes de cada grupo que reconocen esa proteína.

**Tabla XV. Frecuencia de reconocimiento de epítomos identificados en la tropomiosina (Lit v 1), AK (Lit v 2), MLC (Lit v 3) y SCP (Lit v 4) según la expresividad clínica, en los pacientes con PODCCP positiva (Grupo A) y PODCCP negativa (Grupo B). AA: Número de aminoácidos de cada proteína.**

Tropomiosina									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3	Epitopo 4	Epitopo 5a	Epitopo 5b	Epitopo 5c	Epitopo 6	Epitopo 7
Frecuencia									
Grupo A (%)	73.3	93.3	46.6	40	73.3	80	86.6	53.3	80
Grupo B (%)	50	66.6	33.3	33.3	16.6	16.6	66.6	33.3	50
AA	1-36	37-63	61-81	82-105	115-150	142-162	157-183	190-210	246-284
MLC									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3	Epitopo 4a	Epitopo 4b	Epitopo 5			
Frecuencia									
Grupo A (%)	50	57.1	35.7	92.9	50	64.3			
Grupo B (%)	14.3	14.3	14.3	86.7	14.3	28.6			
AA	13-30	22-48	49-66	58-90	79-99	118-141			
SCP									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3						
Frecuencia									
Grupo A (%)	90	70	0						
Grupo B (%)	100	66.6	0						
AA	10-36	49-72	130-147						
AK									
	Epitopo 1	Epitopo 2	Epitopo 3	Epitopo 4a	Epitopo 4b	Epitopo 5	Epitopo 6	Epitopo 7	
Frecuencia									
Grupo A (%)	38.5	7.7	69.2	92.3	15.4	53.8	84.6	84.6	
Grupo B (%)	14.3	14.3	14.3	86.7	14.3	28.6	0	28.6	
AA	1-18	25-42	64-96	121-141	142-159	160-192	232-255	319-342	

Para determinar la frecuencia de reconocimiento de cada alérgeno, se consideraron todos los epítomos. En general, la frecuencia y la intensidad de reconocimiento para las cuatro proteínas fue mayor en el grupo A que en el grupo B, tal y como se representa por el cambio doble de los Z scores. Para los 15 sueros del grupo A, la frecuencia de reconocimiento del alérgeno fue la siguiente: Lit v 1, 15 (100%), Lit v 3, 14 (93%), Lit v 2, 13 (87%) y Lit v 4, 10 (67%). Para los 11 sueros del grupo B, Lit v 1, 6 (54%); Lit v 3, 7 (64%); Lit v 2, 7(64%) y Lit v 4, 3 (27%). Para ambos grupos, la intensidad de la fijación de IgE fue superior para Lit v 1 que para los otros alérgenos (Figura 38).



**Figura 38.** Análisis por Tile-map de los péptidos identificados. En azul, se muestra la diferencia de intensidad de la fluorescencia entre los pacientes del Grupo A y los controles. En rosa, la diferencia de intensidad entre los pacientes del grupo A y los del grupo B. Los puntos azules muestran los epítomos con diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A y los controles. Los puntos rosas muestran los epítomos con diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A y el Grupo B. Todos los análisis se realizaron considerando una diferencia estadísticamente significativa para una  $p < 0,01$ ,  $FDR < 0,05$

Los pacientes del grupo A mostraron una fijación más intensa que los del grupo B. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en frecuencia e intensidad de reconocimiento entre los grupos A y B de solamente algunos epítomos de cada alérgeno, como se determinó según el análisis en el Tile map ( $p < 0,01$ ) con una FDR  $< 0,05$ .

Estos epítomos fueron: Lit v 1 epítomos 1, 2, 5a/5b/5c, 7; Lit v 2 epítomos 6 y 7, Lit v 3 epítomos 1, 2, 4a/4b y 5, y Lit v 4 epítomo 1 (Figura 36).

#### *Eficiencia diagnóstica de la detección de IgE a los alérgenos de gamba y sus epítomos.*

Los resultados de sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo y la eficiencia diagnóstica de mediciones de IgE específica a los alérgenos de gamba y a los epítomos individuales se muestran en la Tabla XVI. Para el análisis de epítomos individuales, se consideraron solamente los epítomos con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B. Además, un alérgeno fue considerado positivo cuando se reconocía al menos a uno de los epítomos de aquellos que muestran diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos. También se analizaron combinaciones de diferentes alérgenos.

**Tabla XVI. Sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN) y eficiencia de las mediciones de IgE específica para diagnóstico de alergia a gamba.**

Proteínas individuales de gamba y rPen a 1							
Proteína		Sensibilidad*	Especificidad*	VPP	VPN	Eficiencia	Valor p
Lit v 2		73.3% (44.9-92.2)	81.8% (48.2-97.7)	84.6% (54.6-98.1)	69.2% (38.6-90)	76.9	0.015
Lit v 3		93.3% (68.1-99.8)	72.7% (39.0-94.0)	66.7% (43.0-85.4)	80% (28.4-99.5)	69.2	0.127
Lit v 4		60% (32.3-83.7)	72.7% (39.0-94.0)	75% (42.8-94.5)	57.1% (28.9-82.3)	65.4	0.130
Lit v 1		100% (78.2-100)	45.5% (16.8-76.6)	71.4% (47.8-88.7)	100% (47.8-100)	76.9	0.007
rPen a 1		88.2% (63.6-98.5)	45.5% (16.8-76.6)	71.4% (47.8-88.7)	71.4% (29.0-96.3)	71.4	0.076
Epítomos individuales que mostraron diferencia estadísticamente significativa entre grupos							
Proteína	Epítipo	Sensibilidad*	Especificidad*	VPP	VPN	Eficiencia	Valor p
Lit v 2	6	73.3% (49.9-92.2)	100% (71.5-100)	100% (71.5-100)	73.3% (49.9-92.2)	84.6	0.0002
	7	73.3% (49.9-92.2)	81.8% (48.2-97.7)	84.6% (54.6-98.1)	69.2% (38.6-90.9)	76.9	0.015
Lit v 3	1	46.7% (21.3-73.4)	90.9% (58.7-99.8)	87.5% (47.4-99.7)	55.6% (30.8-78.5)	65.4	0.083
	2	53.3% (26.6-78.7)	90.9% (58.7-99.8)	88.9% (51.8-99.7)	58.8% (32.9-81.6)	69.2	0.036
	4a	86.7% (59.5-98.3)	45.5% (16.8-76.6)	68.4% (43.5-87.4)	71.4% (29.0-96.3)	69.2	0.094
	4b	46.7% (21.3-73.4)	90.9% (58.7-99.8)	87.5% (47.4-99.7)	55.6% (30.8-78.5)	65.4	0.083
	5	60% (32.3-83.7)	81.8% (48.2-97.7)	81.8% (48.2-97.7)	60% (32.3-83.7)	69.2	0.050
Lit v 4	1	60% (32.3-83.7)	72.7% (39.0-94.0)	75% (42.8-94.5)	57.1% (28.9-82.3)	65.4	0.130
Lit v 1	1	73.3% (49.9-92.2)	72.7% (39.0-94.0)	78.6% (49.2-95.3)	66.7% (34.9-90.1)	73.1	0.044
	2	93.3% (68.1-99.8)	63.6% (30.8-89.1)	77.8% (52.4-93.6)	87.5% (47.4-99.7)	80.8	0.003
	5a	73.3% (49.9-92.2)	90.9% (58.7-99.8)	91.7% (61.5-99.8)	71.4% (29.0-96.3)	80.8	0.001
	5b	73.3% (49.9-92.2)	90.9% (58.7-99.8)	91.7% (61.5-99.8)	71.4% (29.0-96.3)	80.8	0.001
	5c	92.9% (66.1-99.8)	54.6% (23.4-83.3)	72.2% (46.5-90.3)	85.7% (42.1-99.6)	73.1	0.021
	7	80% (51.9-95.7)	72.7% (39.0-94.0)	80% (51.9-95.7)	72.7% (39.0-94.0)	76.9	0.014

\*Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN calculados con un intervalo de confianza de 95%.

En general, la eficiencia diagnóstica la detección de IgE a determinados epítomos individuales es superior a la determinación de IgE al alérgeno completo.

Si tenemos en cuenta determinados epítomos individuales, la mayor eficiencia diagnóstica se observó para el epítipo 6 de Lit v 2 (85%), y los epítomos 2, 5a y 5b (81%) de Lit v1. El VPN más alto fue para los epítomos de Lit v 1, 2 y 5c (87,5% y 85,71%, respectivamente). El mayor VPP se encontró para el epítipo 6 de Lit v 2 (100%), los epítomos 5a y 5b de Lit v1 (92%), y los epítomos 1, 2 y 4b de Lit v 3 (88%). Todos estos epítomos obtuvieron una especificidad superior al 90%. Para la sensibilidad, estos epítomos mostraron valores más bajos: el epítipo 6 de Lit v 2 y los epítomos 5a y 5b de Lit v 1 (73%), los epítomos 1, 2 y 4b de Lit v 3 (50%).

En cuanto a la eficiencia de diferentes alérgenos, tanto Lit v 1 como Lit v 2 mostraron la misma eficiencia diagnóstica (77%), seguido por Lit v 3 (70%) y Lit v 4 (65%). La sensibilización a Lit v 2 (epítomos 6 y/o 7) obtuvieron el mayor VPP (85%), seguido por Lit v 4 (epítipo 1) (75%), Lit v 1 (epítomos 1, 2, 5a, 5b, 5c, 7) (71%) y Lit v 3

(epítomos 1, 2, 4a, 4b, 5) (67%). Lit v 1 y Lit v 3 mostraron el mayor VPN (100% y 80%, respectivamente) y Lit v 1 mostró la sensibilidad más alta (100%) de las cuatro proteínas, pero la especificidad más baja (45%), mientras que la sensibilización a Lit v 3 tenía una sensibilidad del 93% y especificidad de 73%. La IgE sérica específica al recombinante Pen a 1 mostró una eficiencia diagnóstica ligeramente más baja que Lit v 1 medida por microarray (71% vs 77%).

#### 9.4. Relación del mapa epitópico según la edad: comparación entre población pediátrica y población adulta.

Dado que los datos obtenidos con los pacientes incluidos en el estudio no conseguían diferencias estadísticamente significativas, se amplió el tamaño muestral con sueros de pacientes alérgicos a gamba de diversas edades almacenados en el depósito de sueros del propio Mount Sinai Hospital (Nueva York, EEUU). Se trataba de pacientes con IgE específica muy positiva y procedentes de áreas geográficas que comprendían Las Palmas de Gran Canaria y Nueva York.

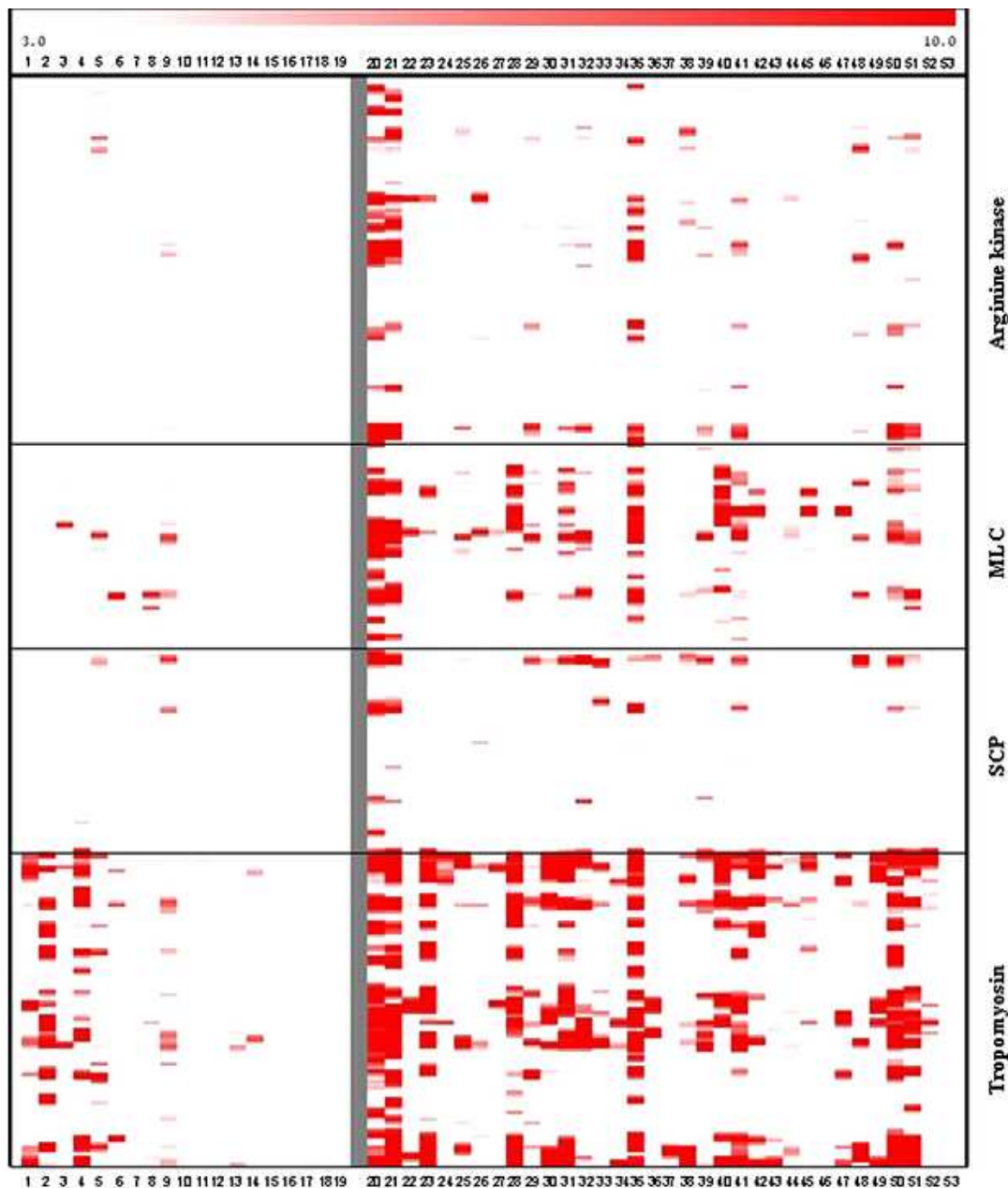
Con este nuevo tamaño muestral se consiguieron reclutar un total de 53 pacientes: 34 niños de edades comprendidas entre 3 y 18 años, con una media de 9 años y 19 (36%) de adultos, de entre 19 y 70 años, con una media de edad de 31,4 años. Los niveles de IgE específica de esta nueva población eran entre 1 y 100 kU/l, con una IgE específica a gamba media de 47 kU/l para niños y 12,5 kU/l para adultos.

La técnica de microarray mostró que los patrones de reconocimiento de alérgenos y de epítomos que unían IgE resultaron muy diferentes entre niños y adultos. La frecuencia de reconocimiento de cada proteína en niños fue de 94% para la Tropomiosina, 70% para Cadena Ligera de la Miosina, 67% para Arginin kinasa y 59% para Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico, mientras que en adultos la tropomiosina fue detectada en un 61%, Cadena Ligera de la Miosina en 31%, Arginin kinasa en 21% y Proteína ligadora del Calcio Sarcoplásmico en 21%, por lo que la



tropomiosina fue el alérgeno más frecuentemente reconocido en ambos grupos de pacientes.

Comparado con los adultos, los niños alérgicos a gamba reconocían más proteínas de gamba y péptidos individuales que los adultos (Figura 39). Además, la intensidad de la fijación de IgE fue mayor en niños. Los péptidos con diferencias estadísticamente significativas entre niños y adultos fueron determinados mediante el test de Wilcoxon, y se muestran en **negrita** en la Figura 37.



**Figura 39.** Comparación de reconocimiento epitópico de gamba entre niños y adultos. Cada uno de los péptidos de cada una de las proteínas alergénicas se muestra en filas. El reconocimiento peptídico de cada uno de los 53 pacientes se muestran en columnas (adultos: del 1 al 19; niños: del 20 al 53). La intensidad de fijación de IgE se muestra mediante media ponderada de z score en una escala gradual que comprende un rango desde  $<3$  (representado en blanco) a  $\geq 10$  (representado en rojo).

# DISCUSIÓN



La alergia a mariscos es una enfermedad frecuente, tanto en población infantil como en población adulta. La gamba es uno de los cuatro alimentos que con mayor frecuencia causan anafilaxia en el mundo<sup>(2,10,11)</sup>. Sin embargo, el único tratamiento que existe actualmente es la evitación del alimento y el tratamiento de posibles reacciones ante contactos accidentales.

Es imprescindible un buen conocimiento de la epidemiología, patogénesis, clasificación biológica y espectro de la reactividad cruzada entre mariscos y otros alérgenos potenciales para que los clínicos estén debidamente entrenados en prevenir, reconocer y tratar la alergia a marisco.

Al contrario de lo que ocurre con otros alimentos como el cacahuete, en el que sabemos que la detección de IgE específica a Ara h 2 predice reactividad clínica<sup>(201)</sup>, o en el caso del huevo, en el que la sensibilización a ovomucoide predice la presencia de síntomas tras exposición a huevo cocido<sup>(202,203)</sup>, o incluso la sensibilización a ovoalbúmina como se ha sugerido en últimas publicaciones<sup>(204)</sup>, en el caso de la gamba existen pocos datos sobre la relevancia clínica de la sensibilización a cada uno de los alérgenos de gamba descritos. No tenemos tampoco datos sobre los posibles marcadores de gravedad o persistencia de la enfermedad en la edad adulta. Uno de los objetivos de este trabajo es determinar si la sensibilización mediada por IgE a determinados alérgenos, o epítomos de dichos alérgenos, pueden predecir la existencia de alergia o su gravedad.

Esta tesis incluye seis procesos:

- 1.- Caracterización clínica y demográfica de una población con síntomas tras la ingestión de gamba.
- 2.- Estudio in vivo mediante pruebas cutáneas y pruebas de provocación (PODCCP).
- 3.- Caracterización inmunológica in vitro de la población estudiada, mediante medición de IgE sérica específica e inmunoblotting.

4.- Mapeo epitópico de cuatro alérgenos responsables de la alergia a gamba.

5.- Comparación clínica, demográfica, de inmunodetección y mapeo epitópico de los pacientes alérgicos frente a los sensibilizados pero no reactivos clínicamente a gamba.

6.- Comparación clínica, demográfica, de inmunodetección y mapeo epitópico de los pacientes adultos frente a la población pediátrica alérgica a gamba.

## **1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA CON SÍNTOMAS DE ALERGIA A GAMBA**

La alergia a alimentos es una enfermedad que está aumentando considerablemente durante los últimos años en el mundo occidental, en cuanto a frecuencia y gravedad de los síntomas<sup>(80)</sup>.

Estos datos podemos confirmarlos gracias a que en España se han realizado, hasta la fecha, dos grandes estudios a nivel nacional de los factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en nuestro país y se conocen con el nombre de Alergológica. El primero tuvo lugar en el año 1992, y el segundo en el año 2005. La tercera edición se publicará en un futuro muy próximo.

Gracias a estos estudios epidemiológicos conocemos que se ha producido un incremento muy significativo de la frecuencia de alergia a mariscos, que fue del 8% en 1992 y del 22% en 2005. Esperaremos los resultados de la nueva edición para comprobar si realmente esta prevalencia sigue aumentando<sup>(11)</sup>.

Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio demográfico exclusivo de pacientes alérgicos a mariscos, por lo que desconocemos las características de los sujetos que acuden a nuestras consultas con síntomas tras ingestión de mariscos. A pesar de que el tamaño muestral de nuestro estudio es pequeño, aporta conocimiento sobre este tema y puede servir de base para trabajos posteriores.

En nuestro trabajo no hemos observado diferencias entre hombres y mujeres como posible factor de riesgo para sufrir síntomas tras la exposición a mariscos. Alergológica 2005<sup>(11)</sup> afirma que no observó diferencias en las causas de la alergia a alimentos en relación con el sexo, apoyando nuestros resultados, excepto con una mayor frecuencia de reacciones frente a leche en el caso de los varones. Esta disparidad no se observa en el caso de los mariscos.

Sin embargo, estudios multicéntricos de Estados Unidos sí observan una mayor predisposición entre los varones a sufrir una probable alergia a alimentos, no sólo con gamba sino también con cacahuete y leche<sup>(205)</sup>.

En cuanto a la edad, la media de aparición de los síntomas tras ingestión de gamba ha resultado de 26 años en nuestro estudio. En España, la media de aparición de síntomas tras ingestión de cualquier tipo de alimentos es de 18 años. En el caso de los mariscos, cerca del 90% de las reacciones ocurren en mayores de 15 años<sup>(11)</sup>.

Siguiendo el concepto tal y como se explicó en la introducción, que para que exista una reacción alérgica frente a un alimento primero debe existir una exposición previa, la incidencia de casos mayor en población adulta se debe a las costumbres alimentarias.

Por este mismo principio de exposición inicial es muy importante tener en cuenta el lugar de residencia, así como el lugar de origen del sujeto para analizar las características de los pacientes, pues define los posibles elementos a los que se ven expuestos, que podrán actuar como alérgeno.

En este sentido, la mayor prevalencia de alergia a marisco ocurre en Asia. Existen estudios en China en los que se describe la gamba como el segundo alimento en frecuencia que produce síntomas en niños menores de 3 años, siendo de un 25,68%<sup>(206)</sup>, o la primera causa de alergia alimentaria en el caso de Taiwan<sup>(207)</sup>. En Tailandia existe también una gran prevalencia de alergia a gamba en población infantil<sup>(208)</sup>.

Estas cifras contrastan enormemente con el 0% registrado en España en un estudio epidemiológico y descriptivo en niños menores de 2 años<sup>(11)</sup>. Podría atribuirse a los hábitos de introducción de los alimentos en las diferentes culturas.

Nuestro trabajo recogió una población fundamentalmente española (64%), a excepción de un paciente asiático, dos portugueses y cuatro procedentes de Sudamérica, éstos con una mayor exposición a ácaros a lo largo de su vida.

Dentro de España, y debido a las grandes diferencias climatológicas que presenta la Península Ibérica, el grado de exposición a potenciales alérgenos también se ve modificado enormemente. Así, existen zonas con una mayor carga ambiental de ácaros, como son por ejemplo zonas costeras y húmedas (Galicia, cornisa cantábrica, costa mediterránea y Canarias) frente a un clima seco en la zona de la meseta. Esta



mayor existencia de ácaros en el ambiente puede condicionar un mayor número de pacientes alérgicos a gamba por sensibilización a tropomiosina y otros alérgenos responsables de fenómenos de reactividad cruzada. Estas diferencias han sido publicadas y expuestas extensamente en una tesis de reciente publicación por la Dra. Cristina Gámez<sup>(127,143,144,209)</sup>. En el caso de nuestra muestra de pacientes españoles, todos ellos procedían de la meseta, con clima seco y una carga ambiental de ácaros baja, excepto dos pacientes andaluces originarios de zona húmeda, por lo que las características de nuestros pacientes se corresponden con sujetos expuestos a esta climatología. Una exposición masiva de ácaros en la infancia puede condicionar sensibilizaciones posteriores.

Todos nuestros pacientes vivían habitualmente en medio urbano, residiendo en una población de más de un millón de habitantes. Además, 68% referían contacto con el medio rural, lo que puede conllevar una mayor exposición a alérgenos que pueden tener reactividad cruzada con gamba, como son por ejemplo los ácaros, la cucaracha o determinados alérgenos relacionados con la exposición a caballo<sup>(210,211)</sup>.

En Estados Unidos se observó también que la raza mostraba grandes diferencias respecto a la sensibilización a alimentos, y estas diferencias eran más notables en relación con la sensibilización a gamba. Entre población afroamericana la prevalencia era de 12,8%, mientras que entre población blanca (no hispana) era de 3,8%. En nuestro estudio, no obtuvimos conclusiones de la posible influencia de la raza en una población sensibilizada a marisco porque todos ellos eran caucasianos, a excepción de un paciente asiático y dos de raza hispana.

En el estudio mencionado, se observó una mayor prevalencia de sensibilización a alimentos entre individuos de clase socio-económica baja respecto a un nivel más alto<sup>(205)</sup>. En España esta prevalencia ocurre exactamente de forma opuesta, siendo un nivel socioeconómico alto el que observa mayor prevalencia (hasta el 43,4%) de alergia a alimentos<sup>(11)</sup>. Lamentablemente, no disponemos de este tipo de datos en nuestro estudio.

## 2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA CON SÍNTOMAS DE ALERGIA A GAMBA

### 2.1. La vía de exposición

Obviamente, la ruta de exposición mayoritaria es la digestiva mediante ingestión. Sin embargo, en adultos que se dedican profesionalmente a la hostelería o niños que se ven expuestos al vapor de cocción en la cocina, mientras están con madres o cuidadores, es también frecuente.

Los síntomas de la alergia a marisco se asocian con frecuencia, aunque no siempre, a la forma de exposición y pueden ocurrir tras la ingestión, contacto cutáneo e inhalación. Como norma general, la ingestión de un marisco alergénico producirá síntomas gastrointestinales, urticaria y otros síntomas compatibles con anafilaxia y respuesta inmediata. Sin embargo, el contacto cutáneo suele producir fundamentalmente manifestaciones dermatológicas y la exposición a inhalantes típicamente causa síntomas respiratorios. Sin embargo, esta clínica no tiene por qué ser la norma, ya que existen determinados casos en los que pueden existir síntomas sistémicos tras la exposición cutánea o respiratoria<sup>(212)</sup>.

Otra forma de exposición es mediante la inhalación de vapores de cocción, como ocurre por ejemplo en el caso de la exposición ocupacional. En un estudio en Grecia se observó que entre trabajadores de fábricas de procesado de pescados y mariscos, el alimento que mayormente producía sensibilización era la gamba, ocurriendo hasta en un 12,5% de los trabajadores<sup>(213)</sup>. Sin embargo, la causa ocupacional de alergia a gamba es muy infrecuente, y a menudo es confundida con la percepción de síntomas debidos a endotoxinas, hongos y aerosoles en plantas industriales de procesados de pescados y mariscos<sup>(214)</sup>. Además, generalmente son reportados como casos aislados<sup>(215)</sup>.

En cuanto a los síntomas tras exposición cutánea, son también muy poco frecuentes y tienen una causa ocupacional, como ocurre por ejemplo en cocineros y trabajadores del sector de la hostelería<sup>(216)</sup>.

La sensibilización por vía epicutánea en trabajadores puede producir al cabo de semanas una reacción alérgica, que se manifiesta mediante urticaria de contacto o eccema, ya que en ocasiones es el síntoma precedente a una reacción tras ingestión<sup>(217)</sup>.

Esto concuerda con nuestros resultados, en los que únicamente 2 pacientes se vieron expuestos a vapor de inhalación. En nuestra población no fue una exposición ocupacional, ya que se trataba de niños que permanecían en la cocina mientras un adulto cocinaba el alimento, y desde entonces no consumieron gamba. En el caso único que sólo presentó síntomas tras contacto cutáneo, consistía en una exposición ocupacional en un trabajador de hostelería que, tras presentar estos síntomas, no se expuso a la ingestión del alimento.

## 2.2. Forma de preparación

Un solo paciente, japonés, presentaba sensibilización a la gamba cruda y, en cambio, toleraba sin ningún tipo de problema gamba cocida.

El proceso de cocción de un alimento puede alterar la alergenicidad de los extractos, tanto in vivo como in vitro. Se ha visto que la cocción durante 15 minutos de gamba produce un extracto que, al aplicarlo en prueba cutánea resulta en una pápula mayor que los extractos crudos, además de detectar mayor número de pacientes con resultado de la prueba positiva. Aunque los extractos de gamba cruda tienen más poder ligador de IgE que los extractos de gamba cocida, se ha demostrado mediante ensayos dot-blot que la unión de IgE a tropomiosina purificada es mayor en la gamba cocida que en la gamba cruda. Esto ocurre porque la tropomiosina purificada tiene una estructura helicoidal alfa secundaria, por lo que la estabilidad de la tropomiosina cocida es inferior que la tropomiosina cruda<sup>(218)</sup>. Los resultados mediante inmunoblotting confirman estos hallazgos, y, aunque no existen más proteínas alergénicas detectadas, sí que revelan mayor intensidad en la fijación de IgE tras la cocción<sup>(219,220)</sup>.

### 2.3. Los síntomas percibidos

La alergia a mariscos, al igual que a cualquier otro alimento, puede producir síntomas que abarcan un rango desde reacciones leves cutáneas hasta reacciones graves que ponen en peligro la vida del paciente, como anafilaxia e incluso se pueden producir casos de muerte. Entre estos dos extremos, otros síntomas que se pueden percibir incluyen prurito generalizado, urticaria, angioedema, manifestaciones pulmonares como disnea, sibilancias y dolor torácico o síntomas digestivos tales como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal<sup>(68)</sup>.

Los síntomas que hemos observado en nuestra población son fundamentalmente cutáneos y de anafilaxia. En un trabajo realizado en un área tropical, Singapur, con una alta incidencia de pacientes alérgicos a gamba, observaron que los síntomas con los que mayormente se presentaba la alergia a gamba fueron el síndrome de alergia oral<sup>(220)</sup>.

En el caso de nuestro país, según Alergológica 2005<sup>(11)</sup>, los síntomas más frecuentemente percibidos por los pacientes alérgicos a mariscos son los cutáneos y la anafilaxia, lo que coincide con nuestros resultados, y seguidos por SAO, síntomas digestivos, asma, rinitis y anafilaxia inducida por ejercicio físico.

### 2.4. Tiempo de latencia

Como cualquier reacción mediada por IgE, el inicio ocurre de forma rápida, apareciendo los síntomas durante los primeros 30 minutos tras la exposición<sup>(222)</sup>. Esto es lo que ocurre en nuestra población analizada, en la que la mayor parte de los pacientes refieren los síntomas de forma inmediata en los primeros 30 min tras la ingestión de gamba. Aunque existen casos descritos de aparición tardía, entre 3 y 24 horas tras la exposición, e incluso reacciones bifásicas en las que, tras la recuperación de los síntomas experimentan una fase tardía de reaparición de las manifestaciones entre 1 y 72 horas después<sup>(223)</sup>, no ha sido el caso de los pacientes estudiados en este trabajo.

### 2.5. Morbilidad asociada

En una población multirracial del East Harlem en Nueva York se vio que existía mayor porcentaje de otras enfermedades alérgicas y relacionadas con la atopia entre los pacientes que sufrían alergia a alimentos que la población general. Estas enfermedades que se observaron fueron asma (50%), dermatitis atópica (52%) y rinitis alérgica (49%)<sup>(224)</sup>.

Este dato también se ha corroborado en España<sup>(11)</sup> donde se ha visto hasta cerca del 41% de los pacientes que también presentaban rinoconjuntivitis. En nuestra muestra, el 60% de los pacientes habían sido diagnosticados de otro tipo de alergia, y fundamentalmente referían síntomas tras exposición a pólenes, lo que concuerda con las características de la aerobiología del área de residencia de los pacientes. Además, existe una relación entre asma infantil o del adolescente y alergia a alimentos, en el que la presencia de ese componente de sensibilización a alimentos conlleva un manejo del asma mucho más difícil<sup>(225)</sup>.

No existen, sin embargo, estudios epidemiológicos que analicen la comorbilidad con alergia a otros alimentos. En nuestra población, el 16% estaban diagnosticados de alergia a pescados, y el 10% a frutas. Este último dato también concuerda con las características generales de sensibilización habitual en Madrid, por lo que se considera un dato en relación con la atopia y que no guarda una relación especial con la alergia a gamba.

## 3. COMPARACIÓN DE DATOS CLÍNICOS, DEMOGRÁFICOS E INMUNOLÓGICOS SEGÚN LA EXPRESIVIDAD CLÍNICA

Como se ha comentado ya previamente en varias ocasiones, la prueba patrón oro para confirmar una alergia a alimentos es la provocación oral, doble ciego, controlada con placebo, puesto que las pruebas cutáneas y la detección de IgE específica a gamba no siempre se asocia con la verdadera expresividad clínica<sup>(153)</sup>. En nuestra muestra estudiada, el 76% de los pacientes que acudieron con síntomas tras

la ingestión con gamba presentaron sensibilización a gamba mediante prueba cutánea, y el 83% mediante IgE sérica específica a extracto completo. Además, sólo el 58,53% presentaba sensibilización a tropomiosina de gamba (Pen a 1) detectada mediante IgE sérica específica.

En un primer momento puede resultar muy llamativo que solamente el 24% de los pacientes a los que se sometieron a provocación oral, ésta resultó positiva. Sin embargo, este dato concuerda con el resultado de las provocaciones doble ciego realizadas con otros alimentos, incluidos estudios previos de provocación oral con gamba en los que el porcentaje era de 30%<sup>(72)</sup>, y remarca la gran importancia de la realización de pruebas de provocación oral en la práctica clínica diaria. En nuestro estudio, más del 50% de pacientes que había padecido síntomas tras la ingestión de gamba y presentaban prueba cutánea y/o detección de IgE específica a gamba toleraron el alimento en la prueba de provocación, lo que demuestra que sigue siendo la prueba patrón oro en el diagnóstico de alergia a alimentos.

Un estudio multicéntrico a nivel europeo, que recluta pacientes procedentes de 12 centros, intenta discernir cuáles son las cantidades de alimentos mínimas que producen una reacción alérgica en un paciente con alergia a alimentos. Este dato es muy necesario a la hora del etiquetado de los alimentos, pues puede predecir qué dosis son “seguras” y presentan riesgo bajo de presentar reacción alérgica para el paciente que lo consuma. Se estimaron las dosis necesarias para avellana, cacahuete, apio, pescado y gamba. Mientras que las dosis estimadas fueron de mg (entre 1 y 10) para todos los alérgenos, para la alergia a gamba la dosis estimada fue considerablemente superior para presentar síntomas (2,5 g de proteína)<sup>(226)</sup>.

En nuestro trabajo, nos hemos asegurado de que la provocación alcanzase al menos una tolerancia de 25 g de gamba, por lo que podemos confirmar que los pacientes que toleraban gamba en la PODCCP no iban a presentar síntomas con trazas o en alimentos ocultos o incluso con una ración de gambas<sup>(227)</sup>.

En cuanto a la edad, los pacientes pediátricos tienen mayor porcentaje de positividad en la provocación. No existen datos en la bibliografía al respecto, pues clásicamente la alergia a gamba se considera una enfermedad de larga evolución<sup>(80)</sup>, y persistente, por lo que el supuesto de que puede resolverse con la edad es una hipótesis basada en hallazgos inmunológicos, como se muestra en esta tesis y se discute posteriormente, más que en estudios clínicos evolutivos.

No existió diferencia en sexo entre pacientes con provocación positiva y negativa, lo cual concuerda con los datos analizados hasta la fecha<sup>(11)</sup>.

Llama la atención que de 13 pacientes que referían síntomas anafilácticos, 5 de ellos tuvieron una provocación negativa (5/13; 38,46%) y eran adultos. Además, una de las pacientes que referían síntomas de anafilaxia (confirmados mediante informe clínico de urgencias y refiriendo sensación de cuerpo extraño a nivel faríngeo, precisando administración de adrenalina) presentó todas las pruebas negativas (pruebas cutáneas, pruebas in vitro, prueba de provocación). Este hecho, aparte de obligarnos a reflexionar sobre el correcto diagnóstico y manejo de la anafilaxia en un servicio de urgencias, vuelve a apoyar la teoría de que la historia clínica, aunque imprescindible, siempre debe ser corroborada con la prueba de provocación, para evitar falsos diagnósticos e instaurar dietas innecesarias. Uno de los datos fundamentales de la anamnesis de un paciente alérgico a gamba es el tiempo de latencia entre la ingestión de gamba y la aparición de los síntomas, ya que, al igual que ocurre con otros alimentos, todos nuestros pacientes que resultaron ser alérgicos a gamba tras la PODCCP, presentaron los síntomas en la primera media hora.

Aunque es cierto que la mayor parte de los pacientes padecían síntomas cutáneos, más de la mitad de los que referían síntomas objetivos pertenecían al grupo B con una PODCCP negativa (12/18; 66,66%). Por eso, cuando se analizan datos epidemiológicos<sup>(11)</sup> y se comparan trabajos de diferentes grupos de investigadores en alergia a alimentos, debe tenerse en cuenta si se ha confirmado el diagnóstico mediante prueba de provocación, ya que si no se ha realizado de esta forma hay un grave peligro de obtener una alta tasa de falsos positivos.

Según nuestros datos, por tanto, la percepción de los síntomas en un órgano diana determinado no predice la reactividad clínica al marisco, puesto que no hallamos diferencias significativas.

Se observó una mayor prevalencia de otras enfermedades alérgicas entre los pacientes del grupo B que los del grupo A, tanto para alérgenos alimentarios como inhalantes. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, este hecho ha sido ampliamente descrito en anteriores trabajos, aunque nunca se había analizado exclusivamente en pacientes alérgicos a gamba. Sin embargo, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas.

La prueba cutánea con extracto completo de gamba presenta una baja eficiencia diagnóstica que no alcanza a diagnosticar las tres cuartas partes de los pacientes alérgicos<sup>(67, 153)</sup>. Sin embargo, en nuestra población detectamos mayor porcentaje de positividad entre los pacientes con reactividad clínica a gamba, respecto a los pacientes que superaron la prueba de PODCCP, con significación estadística. Las pruebas cutáneas, tanto a gamba como a otros mariscos, las hemos realizado mediante técnica de prick-prick, puesto que se ha demostrado que esta técnica tiene una mayor concordancia con las pruebas de provocación con alimentos<sup>(152)</sup>. De hecho, la totalidad de los pacientes con provocación positiva detectaban sensibilización mediante prueba cutánea, lo que indica una alta sensibilidad de esta prueba, aunque su especificidad sea menor<sup>(153)</sup>. La prueba cutánea con otros invertebrados también fue superior entre los pacientes del grupo A, tanto en el caso de la cucaracha, como el mosquito y el anisakis, pero únicamente se halló diferencia significativa en el caso de la prueba cutánea positiva a ácaros. Sin embargo, podemos deducir que esta sensibilización, o bien es por reactividad cruzada con alérgenos que no tienen relevancia clínica, o bien es subclínica y no muestra síntomas en los pacientes, ya que el diagnóstico confirmado de alergia a ácaros mostraba exactamente el porcentaje contrario, siendo muy superior en el caso de los pacientes con provocación negativa que entre los pacientes con provocación positiva<sup>(209)</sup>.



Un mayor porcentaje de pacientes del grupo A (entre el 58 y el 82%) presentaron positividad a las pruebas cutáneas con otros mariscos, respecto a aquellos pacientes del grupo B, siendo una diferencia especialmente llamativa en el caso de la almeja y la vieira. Además, un paciente presentaba prueba cutánea exclusivamente a gamba. Sin embargo, desconocemos su significado clínico. Sabemos muy poco de la alergia a almeja, encontrando únicamente casos clínicos aislados en la bibliografía, generalmente en el campo del asma ocupacional, que ocurren en trabajadores de industria marisquera<sup>(228-230)</sup>. Algo similar ocurre en el caso de la vieira, en el que la falta de estudios sobre alérgenos y características clínicas e inmunológicas es evidente, y quizás la razón sean el bajo consumo y, por tanto, la baja prevalencia de este alimento como alérgeno<sup>(231)</sup>. Únicamente no se obtuvo diferencia en el porcentaje de pacientes con prueba cutánea positiva en el caso del caracol y el calamar. Aunque se reconoce a la tropomiosina como alérgeno responsable de la alergia a calamar, su reactividad cruzada con la tropomiosina de gamba no es bien conocida<sup>(232)</sup>. En el caso del caracol puede resultar lógico, ya que los pocos casos reportados parecen indicar que los alérgenos responsables son diferentes a los mayoritarios en el caso de la gamba<sup>(233-235)</sup>. Es muy probable que exista una reactividad cruzada alta entre los distintos tipos de mariscos, sin embargo, son muy pocos los trabajos que se refieren a esto, y la alergia a otros mariscos distintos a la gamba prácticamente no ha sido analizada. En un análisis de los resultados de pruebas cutáneas en una población alérgica a marisco en Hong Kong, se observa que el 65% de los pacientes presentaba positividad en la prueba cutánea a más de uno de los mariscos, siendo más frecuente entre mariscos de la misma especie pero también entre algunos moluscos y crustáceos<sup>(236)</sup>. No obstante, el significado clínico de la positividad de estas pruebas a otros artrópodos, y especialmente mariscos, se desconoce y en nuestro trabajo no se ha estudiado.

La determinación más sencilla, posible de realizar en la mayoría de los centros al estar automatizada, es la determinación de IgE específica sérica. Existen discrepancias referentes a si los niveles de IgE específica a un alimento pueden predecir el resultado de la provocación oral. En nuestra muestra, tanto la IgE específica a gamba como a tropomiosina resultó claramente superior entre los

pacientes del grupo A que los del B, con diferencia de  $p < 0,0001$ , lo que indica que es un factor predictor para determinar una provocación positiva. De hecho, el 94% de los pacientes alérgicos presentaron sensibilización a tropomiosina de gamba (Pen a 1) mediante IgE sérica específica. Recientemente se tiende a hablar más de la relación de IgE específica a un alérgeno con respecto a la IgE total<sup>(237)</sup>.

En relación con sensibilización a otros invertebrados, los pacientes alérgicos a gamba presentan una IgE específica superior a todos los invertebrados testados que los no alérgicos, siendo la diferencia estadísticamente significativa. De hecho, ya en estudios previos se encontró una asociación positiva entre los niveles de IgE específica a gamba, cucaracha y ácaros del polvo. Se observan por ejemplo, cifras elevadas de IgE específica a gamba sin repercusión clínica en pacientes expuestos a altas concentraciones de cucaracha en el domicilio<sup>(238)</sup>.

En nuestro trabajo, lo que observamos es que los pacientes alérgicos a gamba, con reactividad clínica comprobada mediante provocación oral, presentan una IgE específica superior a ácaros, cucaracha, anisakis y mosquito, siendo especialmente superior en el caso del mosquito si lo comparamos frente al grupo que no reacciona clínicamente tras la exposición a gamba.

Un análisis similar se obtiene de todos los mariscos frente a los que se ha determinado IgE específica. Hemos obtenido una diferencia entre los pacientes de ambos grupos similar a gamba y a tropomiosina en el caso de la IgE específica a calamar, pulpo y mejillón, siendo superior en los pacientes del grupo A. Llama la atención el caso del calamar, en el que esta diferencia se obtiene en la IgE específica y en cambio no en la prueba cutánea.

Como se ha mencionado antes, no existen muchos trabajos enfocados hacia el estudio del marisco, aunque sí se señala a la tropomiosina como responsable de la alergia a otros crustáceos, moluscos y cefalópodos<sup>(239)</sup>, aunque actualmente sabemos que también otros alérgenos son responsables. Sin embargo, el significado clínico y amplios estudios epidemiológicos bien diseñados, que incluyan provocación oral con el alimento, están todavía por llegar.

Aunque parece claro el dato de que la IgE específica a gamba, tropomiosina, y en general a todos los mariscos testados es superior en el caso de pacientes alérgicos a gamba que en los tolerantes, sería interesante obtener cuál es el valor de IgE predictor de esta reactividad clínica. Así, desde hace años, existen varios intentos de conseguir hallar un punto de corte de IgE específica, que pueda predecir si la provocación será positiva o negativa. Este simple valor puede hacer que la práctica del clínico sea mucho más sencilla, y el paciente no sea sometido a una prueba de alto riesgo por su susceptibilidad individual. Además, el señalar si una prueba entraña mayor o menor peligro para el paciente, puede indicar el lugar dónde realizar la provocación, si es posible realizarla en un lugar con menor equipación (ej, clínica privada) o por el contrario, precisa, por ser de mayor riesgo, incluso llevarla a cabo en una unidad de cuidados intensivos.

Nuestro estudio demuestra que, si bien la positividad de la prueba cutánea con extracto comercial no predice la reactividad clínica, la negatividad de la prueba en técnica prick-prick prácticamente la descarta, indicando que la prueba de provocación supondrá un bajo riesgo.

Aunque en la actualidad no existen publicados datos sobre los niveles de IgE sérica específica a gamba predictores de una provocación positiva, estos análisis se han llevado a cabo con otros alimentos. Así se ha publicado el punto de corte que determina una provocación con huevo positiva con IgE a extracto completo superior a 1,5 kU/l, con un nivel de certeza de 95%<sup>(240)</sup>. En un estudio de 30 niños alérgicos a lenteja, se observó que aquellos con una IgE específica inferior a 4,9 kU/l tenían una mayor probabilidad de conseguir la tolerancia frente a aquellos con una IgE específica superior a 4,9 kU/l (68,4% vs. 18,2%) ( $p = 0,008$ )<sup>(241)</sup>. En el caso de la leche, se observó que la persistencia de esta alergia estaba relacionada con variantes del gen STAT6 y que los pacientes con los niveles de IgE específica menor de 6 kU/L superaban su alergia a leche antes que los niños que presentaban una IgE específica inicial, a extracto completo de leche igual o superior a 6 kU/L ( $p < 0,001$ )<sup>(242)</sup>.

Sin embargo, en otros estudios se ha estimado el punto de corte para huevo en 6 kU/l, para leche en 32 kU/L; cacahuete, 15 kU/L y pescado 20 kU/L, también con

un porcentaje de probabilidad del 95%<sup>(243)</sup>. Estas diferencias pueden explicarse por el diferente tamaño muestral y la distinta caracterización de la población estudiada así como el tamaño del área bajo la curva tras obtener la curva ROC.

En nuestra muestra poblacional, hemos encontrado que valores de IgE específica frente al extracto completo de gamba inferiores a 2,32 kU/l son predictores de una PODCCP negativa. Sin embargo, hemos analizado también los valores de IgE a tropomiosina, encontrando como punto de corte el valor de 0,71 kU/l con una sensibilidad menor, del 86,7% que la del extracto completo de gamba.

Para comprobar si también se podía aumentar la sensibilidad diagnóstica, se calcularon los mismos valores de IgE específica frente a otros invertebrados, hallando la sensibilidad mayor en el caso de la cucaracha (IgE específica  $\geq 0,99$  kU/l) y de mosquito (IgE específica  $\geq 1,44$  kU/l) con una sensibilidad de 93,8%, lo que concuerda con el resto de parámetros in vivo realizados en los pacientes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tamaño muestral es pequeño y son necesarias poblaciones más amplias para poder confirmar este hallazgo. En el caso de los crustáceos, como es de esperar ante la mayor reactividad cruzada entre estos mariscos, la sensibilidad aumenta hasta el 100% obteniendo valores para IgE a langosta superiores a 1,12 kU/l, de IgE a cangrejo de mar mayores a 1,13 kU/l y para extracto completo de cangrejo de río superior a 1,11 kU/l son predictores de una provocación positiva, aunque del mismo modo deben tomarse estos resultados con precaución ya que la muestra es pequeña. En el caso de los cefalópodos y de los bivalvos, la sensibilidad de los puntos de corte resultaron mucho menores, igual que ocurrió en el caso del caracol. Estos resultados pueden ser atribuidos a una menor reactividad cruzada debida a la existencia de una mayor distancia taxonómica entre las especies y por tanto, menor homología.

#### **4. COMPARACIÓN DE DATOS CLÍNICOS, DEMOGRÁFICOS E INMUNOLÓGICOS SEGÚN LA EDAD**

Se admite que la alergia a marisco, y en concreto a gamba, es más frecuente entre población adulta que en población infantil<sup>(11)</sup>. Esto ocurre si tenemos en cuenta la población general, pero, sin embargo, en nuestra muestra de pacientes, aquellos que resultaron con provocación positiva fueron en su mayoría niños. Quizás también puede indicar que la alergia a marisco se puede superar a lo largo de los años de vida del sujeto, pero para poder obtener esta conclusión necesitaríamos datos de seguimiento a largo plazo de la historia natural de alergia a marisco en cada uno de los pacientes que no están disponibles en la actualidad en la literatura científica publicada.

Si analizamos los datos totales y comparamos datos clínicos, demográficos e inmunológicos dividiendo a nuestra muestra en población adulta (M) e infantil (P), tal y como se muestra en el apartado de resultados, es posible que se haya cometido un error de sesgo de selección ya que la mayor parte de la población pediátrica pertenece al grupo A. Por tanto, caemos en el riesgo de estar analizando realmente diferencias entre los grupos A y B. Por este motivo, el análisis final lo realizamos mediante la comparación entre niños y adultos de exclusivamente el subgrupo de población alérgica a gamba, aunque previamente hayamos mostrado todos los datos. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución si se pretende extrapolar a la población general, ya que el tamaño muestral estudiado de esta forma y eliminando el sesgo es reducido (N=17).

Hasta la fecha, no existen estudios que comparen características clínicas y/o demográficas entre población adulta y población infantil. Sin embargo, en nuestros pacientes no hallamos diferencias significativas en relación a sexo. Tampoco se pueden analizar resultados respecto al lugar de origen, puesto que todos los niños eran madrileños.

En relación con los síntomas percibidos, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre la población infantil y la población adulta. Sin

embargo, la anafilaxia fue más frecuente entre los adultos que entre los niños. Por el contrario, éstos padecieron más frecuentemente broncoespasmo tras la exposición a gamba.

A excepción de la alergia al polen, no existieron diferencias entre ambos grupos en relación con la morbilidad asociada, ni frente a otros inhalantes ni tampoco en relación con otros alimentos. No existe una explicación del mayor porcentaje de pacientes polínicos entre la población infantil, y probablemente sea un hallazgo casual.

La reproducibilidad de las pruebas cutáneas entre niños escolares y adultos ha sido demostrada, por lo que la comparación entre ambos grupos es perfectamente aceptable<sup>(244)</sup>. Las pruebas cutáneas mostraron un mayor porcentaje de pacientes adultos con positividad frente a invertebrados, especialmente cucaracha y mosquito, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población pediátrica. Exactamente los mismos resultados se obtuvieron al analizar las pruebas cutáneas frente a otros mariscos, por lo que no hemos encontrado que existan diferencias respecto a estas pruebas en función de la edad.

No ocurre lo mismo con la determinación de IgE específica. Se obtuvieron unos valores superiores de IgE específica tanto a gamba como a tropomiosina entre los niños alérgicos a gamba que los adultos alérgicos, siendo la diferencia estadísticamente significativa en el caso de la tropomiosina. En relación a los datos de IgE específica a invertebrados y otros mariscos, se obtuvieron también valores muy superiores en los pacientes del grupo pediátrico. Aunque no se obtuvo significación estadística, podría apoyar la teoría de que la sensibilización a gamba disminuye con la edad, aunque para esta afirmación es precisa la confirmación con trabajos multicéntricos de seguimiento que abarquen un número de pacientes superior.

## 5. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LOS ALÉRGENOS RECONOCIDOS POR LA POBLACIÓN

### 5.1. Gamba cruda y cocida

En nuestro análisis mediante SDS-PAGE y posterior inmunoblotting, tanto los extractos de gamba cruda como los extractos de gamba cocida presentan perfiles similares. Las bandas fijadoras de IgE se encuentran en un rango entre 20 y 100 kDa, con dos bandas que muestran una fijación más intensa en torno a los 20 y 37 kDa.

Existen estudios previos demostrando que la temperatura superior a 55°C provoca un desplegamiento de las proteínas, haciendo que pierdan su estructura secundaria y terciaria, pero conservando su estructura primaria<sup>(245)</sup>.

En nuestro trabajo, hemos encontrado que tanto la banda fijadora de 37 kDa como la de 20 kDa son termorresistentes, lo que concuerda con otros estudios publicados hasta la fecha.

Sin embargo, cuando comparamos el porcentaje de reconocimiento de pacientes de cada grupo que reconocen cada una de las bandas proteicas, encontramos grandes diferencias. Esto parece significar que los pacientes con alergia a gamba que muestran reactividad clínica fijan con mayor intensidad y en mayor número su IgE a bandas proteicas del extracto, frente a aquellos pacientes que, pese a haber presentado en alguna ocasión síntomas y estar sensibilizados tras la ingestión de gamba, pueden tolerar una ración de ésta sin incidencias.

La tropomiosina es una proteína entre 34 y 36 kDa, y la arginina-kinasa presenta un peso molecular de 40 kDa, por lo que hipotetizamos que las bandas proteicas entre esos pesos moleculares pueden referirse a estos dos alérgenos descritos en gamba.

En cambio, la Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico (Lit v 4) y la Cadena Ligera de la Miosina (Lit v 3) son proteínas en torno a los 17 y 20 kDa, por lo que esta segunda banda proteica que aparece en la mayor parte de los pacientes alérgicos a gamba puede corresponderse a estas otras dos proteínas.

## 5.2. Electroforesis unidimensional e inmunoblotting con *D.pteronyssinus*, nPen m 1 y rDer p 10

Cuando observamos los resultados de medición de la proteína natural nPen m1 obtenemos unos resultados muy similares a la medición de IgE específica frente a tropomiosina (rPen a 1) analizados mediante CAP. De hecho, los resultados de esta pruebas resultaron positivos en todos los pacientes del grupo A, excepto en 2, que fueron los pacientes números 6 y 8. Sin embargo, el paciente número 6, a pesar de presentar negatividad al reconocimiento de Pen a 1 mediante detección por CAP y también mediante la detección por inmunoblotting a Pen m 1, presenta IgE específica al extracto completo de gamba con ambas técnicas. Por eso, no podemos excluir la posibilidad de que el paciente presente alergia a gamba causada por la sensibilización a otros alérgenos, como por ejemplo la arginin-kinasa. Esta proteína, la arginina-kinasa, tal y como hemos visto antes, presenta un peso molecular muy similar al de la tropomiosina.

Debido a la alta reactividad cruzada entre nPen m 1<sup>(144)</sup> y la tropomiosina recombinante de *S. melantho*, podemos definir como marcador de sensibilización y reactividad clínica la utilización de cualquiera de las tropomiosinas recombinantes de gamba.

Como ya se ha comentado previamente, se ha sugerido que la tropomiosina es posiblemente la responsable de la reactividad cruzada entre alérgenos alimentarios y aeroalérgenos de origen animal, tales como el ácaro del polvo o la cucaracha. Esta reactividad cruzada ocurre cuando la exposición y por tanto, sensibilización a un determinado alérgeno alimentario puede desembocar en la sensibilización a ciertos alérgenos y viceversa<sup>(130)</sup>. De hecho, se ha demostrado que



pacientes alérgicos a ácaros y/o cucaracha que nunca habían tenido contacto con gamba, presentaban una IgE específica a gamba.

También se ha publicado un estudio que sugiere la reactividad cruzada a raíz de la sensibilización primaria opuesta, es decir, que la sensibilización a tropomiosina de gamba puede ocasionar alergia a ácaro y a *Blatella germanica*<sup>(27)</sup>. Los resultados que obtuvimos nosotros a partir de los estudios de inhibición indican que existen epitopos similares tanto en la tropomiosina de gamba como en la de ácaro de polvo y que pueden reconocer IgE, pero serían precisos más estudios de la secuencia de péptidos y de la estructura terciaria de los epitopos más habituales que puedan ayudar a discernir el mecanismo molecular de la reactividad cruzada<sup>(133)</sup>.

Entre los pacientes del grupo A en los que se ha analizado el estudio de reconocimiento proteico por inmunoblotting, hay más sujetos alérgicos a ácaros que entre aquellos del grupo B. Esto puede estar originado por el papel que juega el reconocimiento por parte de la IgE de estos pacientes al extracto completo de gamba y al de *D. pteronyssinus*. Ninguno de los pacientes con alergia respiratoria a ácaros presentó resultados positivos de IgE específica mediante técnica de CAP a rPen a 1. Sin embargo, en 2 pacientes de este grupo, sí se detectaban bandas proteicas a nPen m 1 mediante inmunoblotting, aunque ninguno de los pacientes reconocía rDer p 10. Esta falta de reconocimiento de Der p 10 y en cambio, positividad frente a Pen m 1 es sorprendente, ya que como regla general el reconocimiento de ambas proteínas se solapa. Quizás pueda deberse a la calidad de rDer p 10, a la sensibilidad de la técnica o a la presencia de epítomos específicos de especie junto a epítomos de reactividad cruzada.

En la mayor parte de los pacientes alérgicos a ácaros, la tropomiosina es un alérgeno menor y la alergenidad a ácaros se ve marcada por otros componentes alérgicos<sup>(246-248)</sup>. Es importante también señalar que los ácaros presentan tropomiosina en concentraciones bajas, probablemente debido a que los ácaros tienen poca cantidad de músculo y están formados predominantemente de exoesqueleto<sup>(249)</sup>.

Algunos pacientes alérgicos a gamba reconocieron algunos alérgenos del extracto de ácaro, lo que puede explicar la alta incidencia de sensibilización a ácaros del polvo en esta población. Sin embargo, su relevancia clínica no está tan clara, tal y como se ha visto en los resultados clínicos y demográficos. Se podría especular que la alta proporción entre nuestra población de pacientes con IgE frente a la arginin-kinasa, y la relativa alta proporción de pacientes con IgE que se une a la banda de 60-80 kDa, posiblemente la hemocianina, sean quizás las responsables de esta reactividad cruzada.

## 6. MAPEO EPITÓPICO DE LOS CUATRO ALÉRGENOS PRINCIPALES

El estudio de péptidos mediante técnicas de microarray es una prueba relativamente novedosa<sup>(198)</sup>. Esta técnica permite conocer los péptidos lineales involucrados en la sensibilización y además tiene la ventaja de que una pequeña cantidad de muestra de suero permite el análisis de una gran cantidad de péptidos.

Investigaciones recientes muestran que la sensibilización clínica se puede asociar con el reconocimiento de determinados epitopos, que además pueden utilizarse como marcadores biológicos. Por ejemplo, pacientes con historia de una reacción alérgica más grave a leche<sup>(165,166,250)</sup>, cacahuete<sup>(167,171)</sup> y huevo<sup>(251)</sup> reconocían un mayor número de epitopos secuenciales. El mapeo epitópico de IgE puede llegar a ser en el futuro una herramienta adicional para el diagnóstico y pronóstico de alergia, además de contribuir al diseño de tratamientos con inmunoterapia más seguros y eficaces. Además, la caracterización de epitopos alérgicos puede contribuir a conocer más profundamente la patogénesis e inducción de tolerancia en alergia alimentaria.

Anteriormente, el mapeo epitópico se realizaba sintetizando los péptidos sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubaban en el suero del paciente<sup>(251)</sup>. Sin embargo, esto llevaba a error al pretender sintetizar un gran número de péptidos, además de consumir gran cantidad de tiempo y consistir en un trabajo exhaustivo y muy costoso. Se requería una gran cantidad de suero, y además, existía limitación en

el número de péptidos que era posible analizar. Esta técnica, llamada SPOT, era exclusivamente cualitativa, por lo que el análisis estadístico era imposible.

Con el desarrollo de la tecnología del microarray<sup>(164,253)</sup> y la evolución de las técnicas de síntesis peptídica<sup>(254)</sup>, se ha podido obtener el mapeo epitópico de varios alérgenos alimentarios, debido a sus numerosas ventajas<sup>(198)</sup>:

- Es posible analizar miles de péptidos simultáneamente, utilizando pequeños volúmenes de suero diluido
- Se ha reducido considerablemente el coste económico de los ensayos individuales, al reducir la muestra biológica necesaria
- Permite una reproducibilidad más potente, haciendo posible el análisis estadístico y la determinación epitópica.

Al contrario de lo que ocurre con los aeroalérgenos, la mayor parte de los alimentos y por lo tanto sus alérgenos están sometidos a un proceso de cocción antes de su consumo y antes de la digestión enzimática en el tracto digestivo. Esto implica que los alérgenos, antes de ser digeridos y expuestos al sistema inmune, sufren una serie de modificaciones por lo que no se encuentran, en el momento de la exposición, en su conformación nativa, por lo que la respuesta inmune ocurre con mayor probabilidad frente a epítopos lineales. Varios estudios demuestran la importancia de los epítopos secuenciales en los alérgenos alimentarios<sup>(171,250,255, 256)</sup>.

Se observó un reconocimiento muy intenso en el caso de los péptidos de tropomiosina y Cadena Ligera de la Miosina, y menor intensidad de fijación para Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico y Arginin-Kinasa. Eso sugiere que los epítopos de tropomiosina y Cadena Ligera de la Miosina sean más secuenciales y probablemente en el caso de Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico y Arginin-Kinasa los epítopos sean más conformacionales, puesto que cuando analizamos la intensidad de la fijación mediante la técnica de análisis por inmunoblotting obtenemos una gran intensidad en el caso de la Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico.

Mediante el mapeo epitópico hemos podido identificar 18 nuevos epítomos de gamba fijadores de IgE: 3 de Lit v 1 : 1, 3, 5b y 5c ; 7 de Lit v 2; 5 de Lit v 3 y 3 de Lit v 4. También hemos reconocido los 4 epítomos descritos con anterioridad en la tropomiosina.

#### 6.1. Comparación epitópica según expresividad clínica

A diferencia de lo que ocurre con otras alergias alimentarias, tenemos muy poca información sobre la relevancia de la sensibilización a alérgenos concretos de gamba. Por ejemplo, sabemos que la IgE específica a Ara h 2 es más precisa para predecir la reactividad clínica de un paciente alérgico a cacahuete que cualquier otro alérgeno<sup>(172)</sup>. Además, como ya se ha resaltado antes, la sensibilización a determinados epítomos de leche<sup>(173)</sup>, huevo<sup>(251)</sup> o cacahuete<sup>(167,171)</sup> son útiles como biomarcadores de gravedad y de persistencia de la enfermedad. Sin embargo, se desconoce el papel de determinados alérgenos o sus epítomos en la reactividad clínica de la alergia a marisco. En este trabajo, se evaluó determinar si la sensibilización a epítomos secuenciales de cuatro alérgenos de gamba ya identificados podrían ser buenos marcadores predictivos de reactividad clínica.

Los pacientes con provocación oral positiva a gamba presentaban una mayor frecuencia de reconocimiento del alérgeno y sus epítomos, en comparación con aquellos con provocación negativa<sup>(133)</sup>.

Para definir aquellos alérgenos o epítomos ligadores de IgE que se relacionaban de forma más estrecha con una reactividad clínica de alergia a gamba, se estudió la asociación entre las provocaciones orales con el resultado de los péptidos sintéticos que se unían a IgE. Así, hemos obtenido que el rendimiento diagnóstico más alto fue de un 85% para el epítomo 6 de Lit v 2 y de un 81% para los epítomos 2, 5a y 5b de Lit v 1. Además, se obtuvo una eficiencia de 77% tanto en los alérgenos completos Lit v 2 como Lit v 1, de 70% para Lit v 3 y de 65% para Lit v 4.

La sensibilización a Lit v 2, especialmente al epitopo 6, parece estar asociada con un resultado positivo de la provocación oral, con un valor predictivo positivo del 100%. Además, otros epitopos parecen ser relevantes en predecir la reactividad clínica a gamba, como son los epitopos 5a y 5b de Lit v 1, con un valor predictivo positivo de 91% y los epitopos 1, 2 y 4b de Lit v 3, con un valor predictivo positivo de 88%. Como la técnica de microarray es más sensible que las pruebas in vitro habituales, es frecuente que se discuta el resultado de los microarray, que deben ser interpretados cautelosamente<sup>(256)</sup>. Es por eso por lo que en los resultados de este trabajo se analizan los epitopos con diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con provocación positiva y negativa.

La sensibilización a epitopos 6 y 7 de Lit v 2 parece ser buen predictor de reactividad clínica. El valor predictivo positivo es, de hecho, superior que si el paciente está sensibilizado exclusivamente a Lit v 2 o a la combinación Lit v 1 y/o Lit v 3. Sin embargo, la relevancia clínica de la sensibilización a Lit v 2 debe ser confirmada con una cohorte más amplia.

A pesar de que no existen dudas acerca de la importancia de los epitopos conformacionales presentes tanto en alérgenos nativos como recombinantes de alérgenos tanto ambientales como alimentarios, se ha demostrado también la importancia de epítomos secuenciales de alérgenos alimentarios en múltiples estudios<sup>(172, 250, 255)</sup>. Además, existen publicaciones previas que muestran que las variantes hipoalergénicas de la tropomiosina fueron diseñadas en base al resultado de experimentos en los que se modificaban epitopos lineales sustituyendo unos aminoácidos por otros, obteniendo así una reducción significativa de la alergenidad<sup>(257)</sup>.

Sin embargo, Albrecht M. et al<sup>(258)</sup> ha puesto en entredicho la relevancia de la unión de IgE a ciertos péptidos de pequeño tamaño, ya que encontró que contribuía poco a la unión de IgE de los alérgenos estudiados, especialmente en la interacción con el anticuerpo en la fase líquida. A pesar de que la IgE se une a los péptidos de Pen a 1 en fase líquida, poco intensamente pero detectable, se encontró que esta unión fue significativa cuando se aplicaron las regiones epitópicas a una matriz molecular

de tropomiosina no alergénica de mamífero, lo que sugirió que los epitopos conformacionales eran más importantes.

Al contrario de lo que ocurre con los aeroalérgenos, muchos alimentos y sus alérgenos sufren un proceso de cocción previo a su consumo. Además, también ocurre una digestión enzimática en el estómago y en el intestino. Debido a que estos alérgenos modificados no se encuentran con su conformación natural, puede verse aumentada la respuesta de la inmunidad humoral a estos alérgenos lineales. Para demostrar la relevancia de la unión de IgE a los péptidos de gamba en nuestros pacientes, se realizó un experimento adicional, diseñado en base al mismo principio de Albrecht M et al<sup>(258)</sup>. Si las secuencias ligadoras de IgE reconocidas por pacientes individuales representaban verdaderos epitopos, estas estructuras podrían inhibir la IgE del alérgeno de forma significativa. O viceversa, el alérgeno completo podría inhibir la unión de los péptidos, demostrando así que no solamente son importantes, sino que además deben estar expuestos en la superficie del alérgeno.

Hemos realizado experimentos de inhibición utilizando extracto completo de gamba cruda y cocida como inhibidores, los cuales teóricamente contienen los cuatro alérgenos de gamba. Obtuvimos resultados similares para las cuatro proteínas. La unión de IgE a los péptidos de las cuatro proteínas fue parcialmente inhibida con el extracto de gamba cruda, mientras que el extracto de gamba cocida inhibió casi completamente la unión de IgE a los péptidos de gamba. Esto demuestra claramente que algunos epitopos lineales del extracto cocido se exponen a la IgE más que en el extracto crudo, aunque en ambos extractos son accesibles a la IgE. Puesto que los epitopos del extracto de gamba cruda están presentes fundamentalmente con su forma conformacional, no producen tanta inhibición como los extractos de gamba cocida, probablemente porque los epitopos se ocultan parcialmente en la estructura tridimensional y no están accesibles a la inhibición. Por lo tanto, solamente cuando se desnaturalizan las proteínas en el extracto cocido, se exponen más secuencias peptídicas que pueden inhibir los péptidos. Esto explicaría la alta alergenicidad de la gamba cocida.

Como conclusión, los pacientes con provocación oral positiva presentan un mayor reconocimiento, tanto de frecuencia como de intensidad, de ciertos epitopos de IgE en los cuatro alérgenos de gamba<sup>(259)</sup>. Podría utilizarse la detección de estos epitopos como biomarcadores para predecir la reactividad clínica en sujetos sensibilizados a gamba. Aunque se halló significación estadística para estos epítomos identificados, no se encontró una clara evidencia clínica. La muestra utilizada es pequeña, por lo que para poder demostrar una aplicación clínica sería necesaria una muestra mayor de pacientes, y posiblemente con heterogeneidad en sus lugares de origen y en su etnia.

## 6.2. Comparación epitópica según edad

La alergia a marisco se considera tradicionalmente una enfermedad crónica y que persiste a lo largo de toda la vida. En este estudio, se comparó la frecuencia de reconocimiento de los diferentes epítomos de los cuatro alérgenos entre población pediátrica y población adulta para caracterizar perfiles epitópicos que puedan predecir la persistencia de alergia a gamba en población adulta.

Tanto los niños como los adultos alérgicos a gamba mostraron diferencias significativas en la frecuencia, diversidad e intensidad del reconocimiento epitópico de cada uno de los alérgenos. La frecuencia del reconocimiento en niños fue casi el doble que en adultos para la mayor parte de las proteínas. En el caso de la tropomiosina, fue reconocida por el 94% de los niños frente al 61% de los adultos, un 70% vs 31% en el caso de la Cadena Ligera de la Miosina, un 67% vs 21% en el caso de la Arginin-Kinasa y un 59% vs 21% para la Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico.

La tropomiosina fue reconocida tanto por población infantil como por población adulta, sin embargo, los otros tres alérgenos (Arginin-Kinasa, Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico y Cadena Ligera de la Miosina) fueron reconocidos especialmente en la población infantil. Ello sugiere que la tropomiosina es probablemente el alérgeno responsable de la persistencia de alergia a gamba en la edad adulta.

En relación con el reconocimiento de determinados epitopos alergénicos, hemos obtenido diferencias estadísticamente significativas entre los niños y los adultos. A pesar de que los niños muestran una gran diversidad de reconocimiento epitópico en los 4 alérgenos, los adultos reconocen preferiblemente epitopos de tropomiosina. Estos epitopos son reconocidos tanto por adultos como por niños, aunque en el caso de los adultos la fijación ocurre con menor intensidad, lo que sugiere que estos epitopos pueden ser los responsables de la persistencia de la alergia a gamba.

En cambio, la población adulta no reconoce la mayoría de los epitopos de Proteína Ligadora del Calcio Sarcoplásmico, y aunque sí reconocen algunos epitopos de Arginin-Kinasa y Cadena Ligera de la Miosina, estos no muestran diferencia estadísticamente significativa cuando los comparamos con los niños<sup>(133)</sup>.

Para evitar el factor de confusión que puede ofrecer un sesgo en la selección de los pacientes, en los que los niños presenten esta diferencia epitópica en relación con presentar mayores niveles de IgE específica, se compararon los resultados entre niños y adultos con similares valores de IgE específica, y como resultado se obtuvo de nuevo una mayor intensidad en la fijación en el caso de los niños.

Aunque es preciso realizar estudios con series más amplias de pacientes, y realizar un seguimiento a largo plazo con provocaciones orales con gamba seriadas, para conocer mejor la historia natural de esta enfermedad, éste es el primer trabajo que muestra la disminución con la edad del reconocimiento de IgE específica a los alérgenos de gamba y a sus epitopos. Las implicaciones clínicas de esta observación son muy importantes, ya que en la actualidad se considera la alergia a gamba como una alergia persistente y una vez hecho el diagnóstico el paciente debe evitar el alimento durante toda la vida. Sin embargo, es posible que de forma similar a lo que sucede con la leche y el huevo los pacientes alérgicos a gamba en la infancia puedan llegar a tolerar este alimento de forma espontánea.

Los pacientes diagnosticados de alergia a marisco que, tras dieta de exclusión más o menos prolongada, presentan un menor reconocimiento epitópico podrían beneficiarse de la realización de provocaciones orales para determinar si han



superado su alergia. Este trabajo revela la necesidad de valorar periódicamente la alergia en los pacientes diagnosticados de alergia a gamba y no asumir que persistirá a lo largo de toda la vida.



# **CONCLUSIONES**



- 1.- Los pacientes que acudieron a consulta por síntomas tras exposición a gamba refirieron, en la mayoría de las ocasiones, síntomas cutáneos o anafilaxia. Se detectó sensibilización a gamba mediante prueba cutánea en el 76% de los casos y mediante IgE sérica específica a extracto completo de gamba en el 83%. La sensibilización a Tropomiosina (Pen a 1) mediante IgE sérica estuvo presente en poco más de la mitad de los pacientes.
- 2.- Sólo en una cuarta parte de los pacientes que acudieron con síntomas tras la ingestión de gamba se confirmó el diagnóstico mediante provocación oral, doble ciego, controlada con placebo.
- 3.- Las características más relevantes de los pacientes alérgicos a gamba fueron las siguientes:
  - a) Todos ellos presentaron los síntomas en la primera media hora tras la ingestión de gamba, y la mayoría en los primeros 10 minutos.
  - b) Todos los pacientes presentaron sensibilización a extracto completo de gamba, tanto en prueba cutánea como en determinación de IgE específica. La sensibilización a Tropomiosina (Pen a 1) mediante detección de IgE sérica específica estuvo presente en el 94% de los pacientes.
  - c) Todos los pacientes reconocieron Tropomiosina (Lit v 1) mediante técnica de microarray. El siguiente alérgeno en frecuencia más reconocido por los alérgicos fue la Cadena Ligera de la Miosina (Lit v 3) (93%), seguido por la Arginin kinasa (Lit v 2) (87%) y por último la Proteína ligadora de Calcio Sarcoplásmico (Lit v 4) (67%).
- 4.- Mediante el mapeo epitópico se identificaron 18 nuevos epítomos fijadores de IgE: 3 de Lit v 1; 7 de Lit v 2; 5 de Lit v 3 y 3 de Lit v 4.

5.- Las diferencias más significativas observadas entre los pacientes con alergia a gamba y los sensibilizados pero tolerantes fueron las siguientes:

a) El 23% de los tolerantes referían la aparición de los síntomas 30 minutos después de la ingestión de gamba.

b) La frecuencia de sensibilización y los niveles de IgE específica a todos los invertebrados y mariscos testados fue significativamente superior en alérgicos que en tolerantes.

c) El inmunoblotting mostró que la tropomiosina del ácaro (Der p 10) y la de la gamba (Pen m 1) fijaban IgE de los sueros de prácticamente la totalidad de los pacientes alérgicos y únicamente de un tercio de los tolerantes.

d) La técnica de microarray mostró una sensibilización mediada por IgE a tropomiosina de gamba (Lit v 1) en la totalidad de los pacientes alérgicos, y en poco más de la mitad de los pacientes tolerantes.

6.- La rentabilidad diagnóstica predictiva de alergia a gamba fue muy elevada para una IgE sérica específica a gamba superior a 2,32 kU/l y para una IgE sérica específica a tropomiosina superior a 0,71 kU/l.

7.- Mediante microarray, la mayor eficiencia diagnóstica se observó para el epítipo 6 de Lit v 2, y los epítopos 2, 5a y 5b de Lit v 1.

7.- Las diferencias más significativas observadas en pacientes pediátricos alérgicos a gamba, frente a los pacientes adultos, fueron las siguientes:

- a) La frecuencia de alergia a gamba, demostrada mediante provocación oral doble ciego controlada con placebo, fue superior en los niños que en los adultos en nuestra muestra de la población.
- b) No existió diferencia significativa en el perfil de sensibilización a mariscos y otros invertebrados mediante pruebas cutáneas entre niños y adultos.
- c) Se observaron valores superiores de IgE sérica específica a tropomiosina en población infantil que en población adulta.
- d) La fijación de IgE a alérgenos de la gamba mediante técnicas de inmunoblotting y a sus epítomos con el análisis mediante microarray fue superior, tanto en frecuencia como en intensidad, en niños que en adultos.





# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Ann Rev Med* 2009; 60:261-77.
2. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:594-602.
3. Fox M, Mugford M, Voordouw J, Cornelisse-Vermaat J, Antonides G, de la Hoz Caballer B, Cerecedo I, Zamora J, Rokicka E, Jewczak M, Clark AB, Kowalski ML, Papadopoulos N, Knulst AC, Seneviratne S, Belohlavkova S, Asero R, de Blay F, Purohit A, Clausen M, Flokstra de Blok B, Dubois AE, Fernandez-Rivas M, Burney P, Frewer LJ, Mills CE. Health sector costs of self-reported food allergy in Europe: a patient-based cost of illness study. *Eur J Public Health*. 2013 Feb 11.
4. Castellazzi AM, Valsecchi C, Caimmi S, Licari A, Marseglia A, Leoni MC, Caimmi D, Miraglia Del Giudice M, Leonardi S, La Rosa M, Marseglia GL. Probiotics and food allergy. *Ital J Pediatr*. 2013 Jul 29;39:47
5. Jansen JJN, Kardinal AFM, Huibers G, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BPM, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 446-56.
6. Longo G, Berti I, Burks AW, Krauss B, Barbi E. IgE-mediated food allergy in children. *Lancet*. 2013 Jul 8. doi:pii: S0140-6736(13)60309-8
7. Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, Ehlers I, Reimann S, Hantke T et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany –a population study. *Allergy* 2004; 59: 338-45.
8. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* 2009; 124:1549-55.
9. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Godbold JH, Sampson HA. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:1322-6.
10. Alergológica. Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España, SEAIC. Madrid: Ed. Nilo 1995. P. 163-83
11. Fernández Rivas, M. Alergia a Alimentos. En: Alergológica 2005. Factores Epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades

- alérgicas en España en 2005. Luzán 5, S.A. editor. Madrid: E. graf SA; 2005. p. 227-253
12. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton M.J. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-Sponsored expert panel report. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(6): 1105-18.
  13. Noel RJ, Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophilic Esophagitis. *N Eng J Med*. 2004;351:940-1.
  14. Heine RG. Eosinophilic esophagitis in children with celiac disease: New diagnostic and therapeutic dilemmas. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:993-4.
  15. Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis: concepts, controversies, and evidence. *Curr Gastroenterol Rep*. 2009;11:220-5.
  16. Sánchez-García S, Ibáñez MD, Martínez-Gómez MJ, Escudero C, Vereda A, Fernández-Rodríguez M, Rodríguez del Río P. Eosinophilic Esophagitis, Celiac Disease, and Immunoglobulin E–Mediated Allergy in a 2-Year-Old Child. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; Vol. 21(1): 73-75
  17. Clark S, Espinola J, Rudder SA, Banerji A, Camargo CA. Frequency of US emergency department visits for food-related acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127 (3): 682-3.
  18. Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 2007; 62: 91-6.
  19. Vetander M, Helander D, Flodström C, Ostblom E, Alfvén T, Ly DH, Hedlin G, Lilja G, Nilsson C, Wickman M. Anaphylaxis and reactions to foods in children – a population-based case study of emergency department visits. *Clin Exp Allergy*. 2012 Apr;42(4):568-77
  20. Tejedor Alonso MA, Moro Moro M, Múgica García MV, Esteban Hernández J, Rosado Ingelmo A, Vila Albelda C, Gomez Traseira C, Cardenas Contreras R, Sanz Sacristán J, Hernández Merino A. Incidence of anaphylaxis in the city of Alcorcon (Spain): a population-based study. *Clin Exp Allergy*. 2012 Apr;42(4):578-89

21. Savage JH, Kaeding AJ, Matsui EC, Wood RA. The natural history of soy allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:683-6
22. Jansson SA, Heibert-Arnlin M, Middelveld RJ, Bengtsson UJ, Sundqvist AC, Kallström-Bengtsson I, Marklund B, Rentzos G, Akerström J, Ostblom E, Dahlén SE, Ahlstedt S. Health-related quality of life, assessed with a disease-specific questionnaire, in Swedish adults suffering from well-diagnosed food allergy to staple foods. *Clin Transl Allergy*. 2013 Jul 1;3(1):21
23. Bacal LR. The impact of food allergies on quality of life. *Pediatr Ann*. 2013 Jul 1;42(7):141-5
24. REGLAMENTO (UE) No 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L304/18-93, 22/11/2011)
25. Sánchez García S., Manso Alonso L. Repercusiones escolares de la alergia y del asma. En: *Procesos médicos que afectan al niño en edad escolar. Repercusiones en el entorno educativo*. M.Rosa Salas Labayen. Ed. Masson, Barcelona 2008. p.252-63
26. Zurzolo GA, Koplin JJ, Mathai ML, Tang MK, Allen KJ. Perceptions of precautionary labelling among parents of children with food allergy and anaphylaxis. *Med J Aust*. 2013;198(11):621-3
27. Martín-Muñoz MF, Fortuni M, Caminoa M, Belver T, Quirce S, Caballero T. Anaphylactic reaction to probiotics. Cow's milk and hen's egg allergens in probiotic compounds. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Dec;23(8):778-84
28. Cummings AJ, Knibb RC, Erlewyn-Lajeunesse M, King RM, Roberts G, Lucas JSA. Management of nut allergy influences quality of life and anxiety in children and their mothers. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21 (4Pt1): 586-94
29. Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Coombs RRA, ed. *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Science Publishers, London; 1968:575-96.

30. Enrique Gómez; Cristobalina Mayorga; Francisca Gómez; Ana Belen Blázquez; Araceli Díaz-Perales; Miguel Blanca; María José Torres. Food Allergy. Management, Diagnosis and Treatment Strategies. Immunotherapy. 2013;5(7):755-768.
31. Brostoff J, Hall T. Hipersensibilidad de tipo I. En: Roitt J, Brostoff J, Male D, eds. Inmunología, 5ª edición. Madrid, Ediciones Harcourt 2000:302-17
32. Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. Science 1987; 235 (4794): 1353-8.
33. Sampson HA. Food Allergy. Part 2. Diagnosis and management. J allergy Clin Immunol 1999; 103(6):981-9
34. Chapman JA, Bernstein IL, Lee RE, Oppenheimer J, Nicklas RA, Portnoy JM, Sicherer SH, Schuller DE, Spector SL, Khan D, Lang D, Simon RA, Tilles SA, Blessing-Moore J, Wallace D, Teuber SS. Food allergy: a practice parameter. Annals of Allergy Asthma & immunology 2006, 96:S1-68
35. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2005; 115:3-12
36. Burks AW, Sampson HA. Food allergies in children. Current problems in pediatrics 1993;23:230-52
37. Vukavic T. Timing of the gut closure. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1984; 3:700-3
38. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology 6th ed. WB Saunders Company, Philadelphia (USA), 2009
39. Yoshimura A1, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. Front Immunol. 2012 Mar 12;3:20.
40. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Journal of allergy and Clin Immunol 2011;127:18-27
41. Doherty TA, Broide DH. Group 2 Innate lymphoid cells: new players in human allergic diseases. J Investig Allergol Immunol 2015; Vol. 25(1): 1-11

42. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptative cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Dec 18. Epub ahead of print.
43. Romagnani S, Human Th1 and Th2 subsets – Doubt no more. *Immunology Today* 1991;12:256-7
44. Rolland JM, Gardner LM, O’Hehir RE. Functional regulatory T cells and allergen immunotherapy. *Current Opinion in Allergy and clinical Immunology* 2010;10:559-66
45. Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2006; 6:12-6
46. O’Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological reviews* 2008;223:114-31
47. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-Beta. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:137-61
48. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. IL-4 inhibits TGF-Beta-induced Foxp3(+) T cells and, together with TGF-Beta, generates IL-9(+) IL-10(+) Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology* 2008; 9:1347-55
49. Veldhoen M, Uyttenhove C, VAN Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 2008; 9:1341-46
50. Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Wegrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129(6):1579-87
51. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 116:961-8)(Burks W. Skin manifestations of food allergy. *Pediatrics.* 2003;111:1617-24

52. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2):228-38
53. van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, Villalba M, Koppelman S, Aalberse R, Rodriguez R, Faye L, Lerouge P. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000; 275(15):11451-8
54. Emara M, Royer PJ, Abbas Z, Sewell HF, Mohamed GG, Singh S, Peel S, Fox J, Shakib F, Martinez-Pomares L, Ghaemmanghami AM. Recognition of the major cat allergen Fel d 1 through the cysteine-rich domain of the mannose receptor determines its allergenicity. *J Biol Chem* 2011;286(15):13033-40
55. Weber RW. Allergens. *Primary Care; Clinics in Office Practise* 1987; 14(3): 435-45
56. Taylor SL, Lemanske RF Jr, Bush RK, Busse WW. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy* 1987; 59(5 Pt 2):93-9
57. Huby RD, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens?. *Toxicological Sciences* 2000; 55(2): 235-46
58. Mygind N, Dahl R, Pedersen S, Thestrup-Pedersen K. Allergens. *Essential allergy*. Oxford, UK: Blackwell Science, 1996: 81
59. Fernández-Rivas M. Alergia a alimentos: patrones de respuesta clínica a los alérgenos alimentarios. *Comité de reacciones adversas a alimentos de la SEAIC. Alergol Immunol Clin* 2003; 18:119-20.
60. Marsh DG FAU, Goodfriend LF, King TP FAU, Lowenstein HF, Platts-Mills TA. Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ* 1986; 64(5):767-74
61. King TP, Hoffman DF, Lowenstein HF, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. *WHO/IUIS Allergen nomenclature Subcommittee. Int Arch Allergy Immunol* 1994; 15(3):224-33
62. Larramendi CH. Food allergy diagnosis: are there any missing factors? A theoretical approach. *Med Hypotheses* 2003; 60(5):731-8
63. Sicherer SH. Determinants of systemic manifestations of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5 Suppl): S251-7



64. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, Verveek E, Mohammadi T, Knul-Brettlova V, Akkerdaas JH, Bulder I, Aalberse RC, van Ree R. Lipid transfer protein: a panallergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122(1):20-32
65. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106 (1 Pt 1):27-36
66. Cases B, Pastor-Vargas C, Dones FG, Perez-Gordo M, Maroto AS, de las Heras M, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. Watermelon profilin: characterization of a major allergen as a model for plant-derived food profilins. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010; 153(3):215-22.
67. Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Pérez-Gordo M, Figueredo E, de las Heras M, Vivanco F. Identification of major allergens in watermelon. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149(4):291-8.
68. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar Biotechnol* 5:339-348, 2003
69. Current Fishery Statistics No. 2008. Disponible en [www.noaanews.noaa.gov/stories2008/20080717\\_seafood.html](http://www.noaanews.noaa.gov/stories2008/20080717_seafood.html)
70. Report on the State of World Fisheries and Aquaculture. Department of Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2008. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm>
71. Presentación de los datos de consumo alimentario en España 2011. Disponible en [http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/dossier\\_prensa\\_presentacion\\_7\\_de\\_marzo\\_2012\\_\(2\)\\_tcm7-197858.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/dossier_prensa_presentacion_7_de_marzo_2012_(2)_tcm7-197858.pdf)
72. Base de datos de consumo en hogares. Disponible en <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta10.asp>

73. Pascal M, Grishina G, Yang A, Ayuso R. A sea urchin roe tropomyosin-like protein is recognized in vitro by shrimp-allergic individuals. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; Vol. 22(4): 286-312
74. Lopata AL, O'Hehir RE, Lehrer SB. Shelfish allergy. *Clin Exp Allergy* 2012;40:850-858
75. Clark S, Bock SA, Gaeta TJ, Brenner BE, Cydulka RK, Camargo CA. Multicenter study of emergency department visits for food allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Feb; 113(2): 347-52
76. Ross MP, Ferguson M, Street D, Klontz K, Schroeder T, Luccioli S. Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the National Electronic Injury Surveillance System. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 166-71
77. Garde JM, Ibáñez Sandín MD. Alergia en menores de 14 años. En: *Alergológica 2005. Factores Epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. Luzán 5, S.A. editor. Madrid: E. graf SA; 2005. p. 325-387
78. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of seafood allergy in the US determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 159-65
79. Goh DL, Lau YN, Chew FT, Shek LP, Lee BW. Pattern of food-induced anaphylaxis in children of an Asian community. *Allergy*. 1999;54:84-86
80. Ayuso R. Grishina G, Bardina L, Carrillo T, Blanco C, Ibáñez MD et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122 (4): 795-802
81. Nowak-Wegrzyn A, Fiocchi A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009 Jun;9(3):234-7
82. Hoffman DR, Day ED Jr, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 1981; 47(1):17-22
83. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J Immunol* 1993; 151:5354-63

84. Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105:49-55.
85. Rosmilah M, Shahnaz M, Zailatul H MY, Noormalin a, Normilah I. Identification of tropomyosin and arginine kinase as major allergens of *Portunus pelagicus* (blue swimming crab). *Trop Biomed* 2012; 29(3): 467-78)
86. Leung PS, Chen YC, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1998; 7(1):12-20
87. Reese G, Jeoung BJ, Daul C, Lehrer S. Characterization of recombinant Shrimp Allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:240-2
88. Subba Rao PB, Rajagopal D, Ganesh KA. B- and T-cell epitopes of tropomyosin, the major shrimp allergen. *Allergy* 1998; 53:44-7
89. Ishikawa M, Suzuki F, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of tropomyosin as a major allergen in the octopus *Octopus vulgaris* and elucidation of its IgE-binding epitopes. *Fisheries Science* 2001; 67(5):934-42
90. Yazdir ZH, Misnan R, Murad S. Identification of tropomyosin as major allergen of white squid (*Loligo edulis*) by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012; 43(1):185-91
91. Leung PS, CHu KH. cDNA cloning and molecular identification of the major oyster allergen from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(8): 1287-94
92. Arrieta I, del Barrio M, Vidarte L, Del Pozo V, Pastor C, Gonzalez-Cabrero J, Cárdaa B, Rojo M, Minguez A, Cortegano I, Gallardo S, Aceituno E, Palomino P, Vivanco F, Lahoz C. Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Ani s 1. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 107(2):263-8.

93. Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in a tropical environment. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 154(3):195-206.
94. Reese G, Schick Tanz S, Lauer I, Randow S, Lüttkopf D, Vogel L, Lehrer SB, Vieths S. Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Clin Exp Allergy*. 2006 Apr;36(4):517-24
95. Leung PS, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:882-90.
96. Ayuso R, Lehrer SB, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Jan;127(1):27-37
97. Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003;170:445-53
98. García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderon-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;144:23-8
99. Binder M, Mahler V, Hayek B, Sperr WR, Schöllner M, Prozell S, Wiedermann G, Valent P, Valenta R, Duchêne M. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J Immunol* 2001; 167(9):5470-7
100. Misnan R, Murad S, Yazdir ZH, Abdullah N. Identification of the major allergens of *Charybdis feriatus* (red crab) and its cross-reactivity with *Portunus pelagicus* (blue crab). *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012; 30(4):285-93
101. Sookrung N, Chaicumpa W, Tungtrongchitr A, Vichyanond P, Bunnag C, Ramasoota P, Tongtawe P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P. *Periplaneta*

- americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies. *Environ Health Perspect* 2006; 114(6):875-80
102. Bobolea I, Barranco P, Pastor-Vargas C, Iraola V, Vivanco F, Quirce S. Arginine kinase from the cellar spider (*Holcnemus pluchei*): a new asthma-causing allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155(2):180-6
  103. Shen HW, Cao MJ, Cai QF, Ruan MM, Mao HY, Su WJ, Liu GM. Purification, cloning, and immunological characterization of arginine kinase, a novel allergen of *Octopus fangsiao*. *J Agric Food Chem*. 2012 Mar 7;60(9):2190-9
  104. Abdel Rahman AM, Kamath SD, Gagné S, Lopata AL, Helleur R. Comprehensive proteomics approach in characterizing and quantifying allergenic proteins from northern shrimp: toward better occupational asthma prevention. *J Proteome Res* 2013; 12(2):647-56
  105. <http://www.allergome.com>
  106. González-Mancebo E, Pastor C, González-De-Olano D, Gandolfo-Cano M, Melendez A, Cuesta J, Zapatero A, Bartolomé B. Identification of allergens in chicken meat allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21(4):326-7
  107. Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, Mita H, Shimakura K. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(2):91-8
  108. Chen HL, Cao MJ, Cai QF, Su WJ, Mao HY, Liu GM. Purification and characterization of sarcoplasmic calcium-binding protein, a novel allergen of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) *Food chem*. 2013; 139(1-4):213-23
  109. Mita H, Koketsu A, Ishizaki S, Shiomi K. Molecular cloning and functional expression of allergenic sarcoplasmic calcium-binding proteins from *Penaeus* shrimps. *J Sci food agric* 2013; 93(7):1737-42
  110. Ayuso R, Grishina G, Ibañez MD, Blanco C, Carrillo T, Bencharitiwong R, Sanchez S, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Sarcoplasmic calcium-

- binding protein is an EF-hand type protein identified as a new shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(1):114-20
111. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol rev* 2000; 80(3):1215-65
  112. Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 1996;21(1):14(7)
  113. Heizmann CW, Hunziker W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem Sci* 1991; 16(3):98-103
  114. Bauermeister K, Wangorsch A, Garoffo LP, Reuter A, Conti A, Taylor SL, Lidholm J, Dewitt AM, Enrique E, Vieths S, Holzhauser T, Ballmer-Weber B, Reese G. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*. *Mol Immunol* 2011; 48 (15-16): 1983-92
  115. Hindley J, Wünschmann S, Satinover SM, Woodfolk JA, Chew FT, Chapman MD, Pomés A. Blat g 6: a Troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6):1389-95
  116. Jeong KY, Kim CR, Un S, Yi MH, Lee IY, Park JW, Hong CS, Yong TS. Allergenicity of recombinant troponin C from *Tyrophagus putrescentiae*. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151(3):207-13
  117. Posch A, Chen Z, Wheeler C, Dunn MJ, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(3):385-95
  118. Sander I, Rozynek P, Rihs HP, van Kampen V, Chew FT, Lee WS, Kotschy-Lang N, Mergent R, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. Multiple wheat flour allergens and cross-reactive carbohydrate determinants bind IgE in baker's asthma. *Allergy* 2011; 66(9):1208-15
  119. Chen YH, Lee MF, Lan JL, Chen CS, Wang HL, Hwang GY, Wu CH. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwanda* (biting midge): clinical analysis

- and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. *Allergy* 2005; 60(12):1518-23
120. Nakamura R, Satoh R, Nakajima Y, Kawasaki N, Yamaguchi T, Sawada J, Nagoya H, Teshima R. Comparative study of GH-transgenic and non-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) allergenicity and proteomic analysis of amago salmon allergens. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 55(3):300-8
  121. Pérez-Gordo M, Pastor Vargas C, Cases B, de las Heras M, Sanz A, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. New allergen involved in a case of allergy to *Solea solea*, common sole. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104(4):352-3
  122. Chuang JG, Su SN, Chiang BL, Lee HJ, Chow LP. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. *Proteomics* 2010; 10(21):3854-67
  123. Piboonpocanum S, Jirapongsananuruk O, Tipayanon T, Boonchoo S, Goodman RE. Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol Nutr Food res* 2011; 55(10):1492-8
  124. Ahmed A, Minhas K, Namood-E-Shahar, aftab O, Khan FS. In silico identification of potential american cockroach (*Periplaneta americana*) allergens. *Iran J Public Health* 2010; 39(3):109-15
  125. Guilloux L, Vuitton DDA, Delbourg M, Lagier A, Adessi B, Marchand CR, Ville G. Cross-reactivity between terrestrial snails (*Helix* species) and house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). II. In vitro study. *Allergy* 1998; 53(2):151-8
  126. Guillen D, Fiandor A, Del Pozo V, Pedrosa M, Phillips-Angles E, Caballero T, Quirce S. Anaphylaxis caused by hemocyanin contained in shrimp cephalothorax. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014 Dec; 113(6):674-675
  127. Gámez C, Zafra M, Boquete M, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, Sánchez-García S, Sastre J, del Pozo V. New shrimp IgE-binding proteins involved

- in mite-seafood cross-reactivity. Mol Nutr Food Res. 2014 Sep; 58(9):1915-25
128. Khanaruksombat S, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Phiriyangkul P. Identification of a novel allergen from muscle and various organs in banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*). Ann Allergy Asthma Immunol. 2014 Sep;113(3):301-6
  129. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(1):14-23
  130. Pascual CY, Crespo JF, Martin-Esteban M. The relevance of cross-reactivity in pediatric allergy. Clin Rev allergy Immunol 1997; 15 (4). 449-60
  131. Pascual CY, Reche M, Fiandor A, Valbuena T, Cuevas T, Esteban MM. Fish allergy in childhood. Pediatr allergy Immunol 2008; 19(7):573-9
  132. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, Rizzo MC, Naspitz CK, Arruda LK. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. J Allergy Clin Immunol 1999; 104:329-337
  133. Ayuso R, Sanchez-Garcia S, Lin J, Fu Z, Ibañez MD, Carrillo T, Blanco C, Goldis M, Bardina L, Sastre J, Sampson HA. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(6):1286-93
  134. Navarro Pulido, AM. Rinitis. En: Alergológica 2005. Factores Epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Luzán 5, S.A. editor. Madrid: E. graf SA; 2005. p.109-131
  135. Sidenius KE, Hallas TE, Poulsen LK, Mosbech H. Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. Allergy 2001; 56:723-33



136. Castillo R, Delgado J, Quiralte J, Blanco C, Carrillo T. Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1996; 24: 93-7
137. Peláez Hernández A, Dávila González I.J. Editores. Blanco Guerra C, Almeida Quintana L, Castillo Sainz R, Sanchez-Monge R, Fernández Rivas M. Síndromes de reactividad cruzada en la alergia a los alimentos. En: *Tratado de Alergología (II)*. Ergon Ed. Madrid: 2007. p. 926-27
138. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 956-61
139. Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy*. 2011 Oct; 66(10):1375-83
140. Barber D, Arias J, Boquete M, Cardona V, Carrillo T, Gala G, Gamboa P, García-Robaina JC, Hernández D, Sanz ML, Tabar AI, Vidal C, Ipsen H, de la Torre F, Lombardero M. Analysis of mite allergic patients in a diverse territory by improved diagnostic tools. *Clin Exp Allergy*. 2012 Jul; 42(7):1129-38
141. Bronnert M, Mancini J, Birnbaum J, Agabriel C, Liabeuf V, Porri F, Cleach I, Fabre A, Deneux I, Grandné V, Grob JJ, Berbis P, Charpin D, Bongrand P, Vitte J. Component-resolved diagnosis with commercially available *D. pteronyssinus* Der p 1, Der p 2 and Der p 10: relevant markers for house dust mite allergy. *Clin Exp Allergy*. 2012 Sep;42(9):1406-15
142. Villalta D, Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Roncarolo D, Amato S, Mistrello G. Detection of a novel 20 kDa shrimp allergen showing cross-reactivity to house dust mites. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb; 42(1):20-4
143. Gámez C, Zafra MP, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, Sastre J, del Pozo V. Simulated gastrointestinal digestion reduces the allergic reactivity of shrimp extract proteins and tropomyosin. *Food Chem*. 2015 Apr 15; 173:475-81.

144. Gámez Gámez C. Estudio alergénico de la gamba *Solenocera melanthero*: identificación de nuevos alérgenos implicados en la reactividad cruzada con el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Fisiología Animal II. Universidad Complutense de Madrid, 2014.
145. Gamboa PM, Asturias J, Martínez R, Antépara I, Jáuregui I, Urrutia I, Fernández J, Sanz ML Diagnostic utility of components in allergy to *Anisakis simplex*. J Investig Allergol Clin Immunol. 2012; 22(1):13-9.
146. Arruda LK, Barbosa MC, Santos AB, Moreno AS, Chapman MD, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis of cockroach allergy. Curr Allergy Asthma Rep. 2014 Apr; 14(4):428.
147. Peng Z, Simons FE. Advances in mosquito allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007 Aug; 7(4):350-4.
148. Obafunwa JO, Rushton P, Busittil A. Inhalation of steaming seafood aroma: sudden death in an asthmatic. J Clin Forensic Med 1996; 3: 45-9
149. Tan BM, Sher MR, Godd RA, Bahna SL. Severe food allergies by skin contact. Ann Allergy Asthma Immunol 2001; 86: 593-6
150. Peláez Hernández A, Dávila González I.J. Editores. Alonso Lebrero E, Fernández Moya L, Laffond Yges E, Ojeda Fernández P. Manifestaciones clínicas de la alergia a los alimentos mediada por IgE. En: Tratado de Alergología (II). Ergon Ed. Madrid: 2007. p. 843
151. Peláez Hernández A, Dávila González I.J. Editores. García Robaina JC, Matheu Delgado V, Sánchez Machín I, Seoane Leston J. Técnicas diagnósticas *in vivo*. En: Tratado de Alergología (I). Ergon Ed. Madrid: 2007.
152. Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE, and food challenges. Allergy 1997; 52: 1031-5.
153. Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MC, Chapman MD, Galvão CE, Kalil J, Morato-Castro FF. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic

- reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Apr;125(4):872-8
154. Myrset HR, Barletta B, Di Felice G, Egaas E, Dooper MM. Structural and immunological characterization of recombinant Pan b 1, a major allergen of northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160(3):221-32
  155. Beyer K, Jarvinen KM, Bardina L, Mishoe M, Turjanmaa K, Niggemann B, Ahlstedt S, Venemalm L, Sampson HA. IgE-binding peptides coupled to a commercial matrix as a diagnostic instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):704-5.
  156. Järvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy*. 2007 Jul;62(7):758-65
  157. Daul CB, Morgan JE, Hughes J, Lehrer SB. Provocation-challenge studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 1988 Jun; 81(6):1180-6.
  158. Beyer K. Characterization of allergenic food proteins for improved diagnostic methods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 189-197
  159. Rance F, Abbal M, Lauwers-Cances V. Improved screening for peanut allergy by the combined use of skin prick tests and specific IgE assays. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:1027-1033
  160. Boyano MT, García-Ara C, Diaz-Pena JM, et al. Validity of specific IgE antibodies in children with egg allergy. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1464-1469.
  161. García-Ara C, Boyano-Martinez T, Diaz-Pena JM, et al. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cow's milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:185-190.
  162. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:891-896.

163. Hill DF, Hosking CS, Reyes-Benito LV. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1031-1035
164. Sampson HA. Improving in-vitro tests for the diagnosis of food hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:257-261
165. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science* 1995; 270(5235):467-70
166. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *Faseb Journal* Jan:2002 16(1):U262-U82
167. Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Feb;107(2):379-83.
168. Beyer K, Ellman-Grunther L, Järvinen KM, Wood RA, Hourihane J, Sampson HA Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jul;112(1):202-7.
169. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003 Jan;33(1):7-13
170. Shin DS, Lee KN, Yoo BW, Kim J, Kim M, Kim YK, Lee YS. Automated maskless photolithography system for peptide microarray synthesis on a chip. *J Comb Chem*. 2010 Jul 12;12(4):463-71
171. Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Apr;113(4):776-82
172. Flinterman AE, Knol EF, Lencer DA, Bardina L, den Hartog Jager CF, Lin J, Pasmans SG, Bruijnzeel-Koomen CA, Sampson HA, van Hoffen E, Shreffler WG. Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in

- relation to severity of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar;121(3):737-743.e10
173. Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, Lin J, Bardina L, Dieguez MC, Wang J, Muriel A, de la Hoz B, Sampson HA. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep; 122(3):589-94. doi: 10.1016/j.jaci.2008.06.040.
174. Ayuso R. Update on the diagnosis and treatment of shellfish allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011 Aug; 11(4):309-16
175. Rolland JM, Varese N, Zubrinich CM, O'Hehir RE. Intractable shellfish anaphylaxis: sensitization by cross-reactive substances in a complementary "immune stimulant" and acrylic nails. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Mar;110(3):211-2
176. Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):558-73
177. Inoue N, Yamamoto A. Clinical evaluation of pediatric anaphylaxis and the necessity for multiple doses of epinephrine. *Asia Pac Allergy*. 2013 Apr;3(2):106-14
178. Banerji A, Rudders SA, Corel B, Garth AM, Clark S, Camargo CA Jr. Repeat epinephrine treatments for food-related allergic reactions that present to the emergency department. *Allergy Asthma Proc*. 2010 Jul-Aug;31(4):308-16
179. Ford LS, Taylor SL, Niemann LM, , Sicherer SH. Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;126(2):384-5
180. Leung DY. Food allergy: are we getting closer to a cure? *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):555-7
181. Sampson HA, Leung DY, Burks AW, Lack G, Bahna SL, Jones SM, Wong DA. A phase II, randomized, double blind, parallel group, placebo controlled oral food challenge trial of Xolair (omalizumab) in peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 May;127(5):1309-10

182. Srivastava KD, Bardina L, Sampson HA, Li XM. Efficacy and immunological actions of FAHF-2 in a murine model of multiple food allergies. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012 May;108(5):351-358
183. Wang J. Treatment of food anaphylaxis with traditional Chinese herbal remedies: from mouse model to human clinical trials. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013 Aug;13(4):386-91
184. Huang F, Nowak-Węgrzyn A. Extensively heated milk and egg as oral immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012 Jun;12(3):283-92
185. Nermes M, Salminen S, Isolauri E. Is there a role for probiotics in the prevention or treatment of food allergy? *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013 Dec; 13(6):622-30.
186. Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Rodes L, Kahouli I, Malhotra M. Probiotics For The Prevention And Treatment Of Allergies, With An Emphasis On Mode Of Delivery And Mechanism Of Action. *Curr Pharm Des.* 2014;20(6):1025-37
187. Enrique E, Malek T, Pineda F, Palacios R, Bartra J, Tella R, Basagaña M, Alonso R, Cisteró-Bahíma A Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a follow-up study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Mar;100(3):283-4
188. Fernández-Rivas M, Garrido Fernández S, Nadal JA, Díaz de Durana MD, García BE, González-Mancebo E, Martín S, Barber D, Rico P, Tabar AI. Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy.* 2009 Jun;64(6):876-83
189. Dupont C, Kalach N, Soulaínés P, Legoué-Morillon S, Piloquet H, Benhamou PH. Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 May;125(5):1165-7
190. Noh G, Lee JH. Specific Oral Tolerance Induction Using IFN-Gamma in 2 Cases of Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. *Case Rep Med.* 2013;2013:259692

191. Dreborg S, Frew A. EAACI Subcommittee on Skin Tests. Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993;48:48-82
192. Comité de reacciones adversas a alimentos. SEAIC. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos. *Alergol Inmunol Clin* 1999; 14: 50-62
193. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods- position paper from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59: 690-7
194. Morgan JE, Daul CB, Lehrer SB. The relationships among shrimp-specific IgG subclass antibodies and immediate adverse reactions to shrimp challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Sep;86(3 Pt 1):387-92
195. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-54.
196. Luengo O, Mollá R, Gámez C, Cardona V, López E, Sastre B eta I. Allergenicity and cross-reactivity of senecio pollen: identification of novel allergens using immunoproteomics approach. *Clin Exp Allergy* 2008; 38 (6):1048-60
197. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1977 Feb 10;252(3):1102-6
198. Lin J, Bardina L, Shreffler WG, Andrae DA, Ge Y, Wang J, Bruni FM, Fu Z, Han Y, Sampson HA. Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Aug;124(2):315-22, 322.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.024
199. Shreffler WG, Lencer DA, Bardina L, Sampson HA. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Oct; 116(4):893-9.

200. Storey JD, Tibshirani R. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in DNA microarrays. *Methods Mol Biol.* 2003;224:149-57
201. Kim J, Lee JY, Han Y, Ahn K. Significance of Ara h 2 in clinical reactivity and effect of cooking methods on allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013 Jan; 110(1):34-8.
202. Haneda Y, Kando N, Yasui M, Kobayashi T, Maeda T, Hino A, Hasegawa S, Ichiyama T, Ito K. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jun; 129(6):1681-2.
203. Alessandri C, Zennaro D, Scala E, Ferrara R, Bernardi ML, Santoro M, Palazzo P, Mari A. Ovomucoid (Gal d 1) specific IgE detected by microarray system predict tolerability to boiled hen's egg and an increased risk to progress to multiple environmental allergen sensitisation. *Clin Exp Allergy.* 2012 Mar;42(3):441-50.
204. Vazquez-Ortiz M, Pascal M, Jiménez-Feijoo R, Lozano J, Giner MT, Alsina L, Martín-Mateos MA, Plaza AM. Ovalbumin-specific IgE/IgG4 ratio might improve the prediction of cooked and uncooked egg tolerance development in egg-allergic children. *Clin Exp Allergy.* 2014 Apr;44(4):579-88.
205. Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Burks AW, Massing M, Cohn RD, Zeldin DC. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Oct;126(4):798-806
206. Liu FL, Ning YB, Ma DF, Zheng YD, Yang XG, Li WJ, Zhang YM, Wang PY. Prevalence of self-reported allergy, food hypersensitivity and food intolerance and their influencing factors in 0-36 months old infants in 8 cities in China. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2013 Nov;51(11):801-6
207. Wu TC, Tsai TC, Huang CF, Chang FY, Lin CC, Huang IF, Chu CH, Lau BH, Wu L, Peng HJ, Tang RB. Prevalence of food allergy in Taiwan: a questionnaire-based survey. *Intern Med J.* 2012 Dec;42(12):1310-5



208. Lao-araya M, Trakultivakorn M. Prevalence of food allergy among preschool children in northern Thailand. *Pediatr Int*. 2012 Apr;54(2):238-43.
209. Boquete M, Iraola V, Morales M, Pinto H, Francisco C, Carballás C, Carnés J. Seafood hypersensitivity in mite sensitized individuals: is tropomyosin the only responsible allergen? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 Mar;106(3):223-9
210. Uzel A, Capan N, Canbakan S, Yurdakul AS, Dursun B. Evaluation of the relationship between cockroach sensitivity and house-dust-mite sensitivity in Turkish asthmatic patients. *Respir Med*. 2005 Aug;99(8):1032-7.
211. Adalsteinsdottir B1, Sigurdardottir ST, Gislason T, Kristensen B, Gislason D. What characterizes house dust mite sensitive individuals in a house dust mite free community in Reykjavik, Iceland? *Allergol Int*. 2007 Mar;56(1):51-6.
212. Steensma DP. The kiss of death: a severe allergic reaction to a shellfish induced by a good-night kiss. *Mayo Clin Proc* 78:221, 2003
213. Kalogeromitros D1, Makris M, Gregoriou S, Chliva C, Katoulis A, Papaioannou D, Rigopoulos D. IgE-mediated sensitization in seafood processing workers. *Allergy Asthma Proc*. 2006 Jul-Aug;27(4):399-403.
214. Bang B, Aasmoe L, Aamodt BH, Aardal L, Andorsen GS, Bolle R, Bøe R, Van Do T, Evans R, Florvåg E, Gram IT, Huser PO, Kramvik E, Løchen ML, Pedersen B, Rasmussen T. Exposure and airway effects of seafood industry workers in northern Norway. *J Occup Environ Med*. 2005 May;47(5):482-92.
215. Fontán M, Añibarro B, Postigo I, Martínez J. Allergy to freshwater shrimp (*Gammarus*). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005;15(2):150-2
216. Goetz DW, Whisman BA. Occupational asthma in a seafood restaurant worker: cross-reactivity of shrimp and scallops. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000 Dec;85(6 Pt 1):461-6.

217. Inomata N, Nagashima M, Hakuta A, Aihara M. Food allergy preceded by contact urticaria due to the same food: Involvement of epicutaneous sensitization in food allergy. *Allergol Int.* 2015 Jan;64(1):73-8.
218. Liu GM, Cheng H, Nesbit JB, Su WJ, Cao MJ, Maleki SJ. Effects of boiling on the IgE-binding properties of tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Food Sci.* 2010 Jan-Feb;75 (1):T1-5.
219. Carnés J, Ferrer A, Huertas AJ, Andreu C, Larramendi CH, Fernández-Caldas E. The use of raw or boiled crustacean extracts for the diagnosis of seafood allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007 Apr;98(4):349-54.
220. Samson KT, Chen FH, Miura K, Odajima Y, Iikura Y, Naval Rivas M, Minoguchi K, Adachi M. IgE binding to raw and boiled shrimp proteins in atopic and nonatopic patients with adverse reactions to shrimp. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Mar; 133(3):225-32.
221. Thalayasingam M, Gerez IF, Yap GC, Llanora GV, Chia IP, Chua L, Lee CJ, Ta Le HD, Cheng YK, Thong BY, Tang CY, Van Bever HP, Shek LP, Curotto de Lafaille MA, Lee BW. Clinical and Immunochemical Profiles of Food Challenge Proven or Anaphylactic Shrimp Allergy in the Tropical Singapore. *Clin Exp Allergy* 2015; 45(3):687-97.
222. Daul CB, Morgan JE, Waring NP, et al. Immunologic evaluation of shrimp-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1987, 80:716.
223. Lee JM, Greenes DS. Biphasic Anaphylactic reactions in pediatrics. *Pediatrics* 2000, 106:762.
224. Taylor-Black S, Wang J. The prevalence and characteristics of food allergy in urban minority children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012; 109(6):431-7
225. Vogel NM, Katz HT, Lopez R, Lang DM. Food allergy is associated with potentially fatal childhood asthma. *J Asthma.* 2008; 45(10):862-6
226. Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Beyer K, Defernez M, Sperrin M, Mackie AR, Salt LJ, Hourihane JO, Asero R, Belohlavkova S, Kowalski M, de Blay F, Papadopoulos NG, Clausen M, Knulst AC, Roberts G, Popov T, Sprikkelman AB, Dubakiene R, Vieths S, van Ree R, Crevel R, Mills EN.

- How much is too much?: Threshold dose distributions for 5 food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2015 Apr;135(4):964-71
227. Fernández-Rivas M, Barreales L, Mackie AR, Fritsche P, Vázquez-Cortés S, Jedrzejczak-Czechowicz M, Kowalski ML, Clausen M, Gislason D, Sinaniotis A, Kompoti E, Le TM, Knulst AC, Purohit A, de Blay F, Kralimarkova T, Popov T, Asero R, Belohlavkova S, Seneviratne SL, Dubakiene R, Lidholm J, Hoffmann-Sommergruber K, Burney P, Crevel R, Brill M, Fernández-Pérez C, Vieths S, Clare Mills EN, van Ree R, Ballmer-Weber BK. The EuroPrevall outpatient clinic study on food allergy: background and methodology. *Allergy* 2015 May;70(5):576-84.
  228. Zhang Y, Wang T, Gao S, Morita E. Novel allergen from the freshwater clam and the related allergy. *J Dermatol*. 2012 Jul;39(7):672-4.
  229. Rodriguez-Del Rio P, Sanchez-Lopez J, Robledo Echarren T, Martinez-Cocera C, Fernandez-Rivas M. Selective allergy to *Venus antiqua* clam. *Allergy*. 2009 May;64(5):815.
  230. Desjardins A, Malo JL, L'Archevêque J, Cartier A, McCants M, Lehrer SB. Occupational IgE-mediated sensitization and asthma caused by clam and shrimp. *J Allergy Clin Immunol*. 1995 Nov;96(5 Pt 1):608-17
  231. Barraclough RM, Walker J, Hamilton N, Fishwick D, Curran AD. Sensitization to king scallop (*Pecten maximus*) and queen scallop (*Chlamys opercularis*) proteins. *Occup Med (Lond)*. 2006 Jan; 56(1):63-6.
  232. Taylor SL. Molluscan shellfish allergy. *Adv Food Nutr Res*. 2008;54:139-77.
  233. Martins LM, Peltre G, da Costa Faro CJ, Pires EM, da Cruz Inácio FF. The *Helix aspersa* (brown garden snail) allergen repertoire. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 Jan;136(1):7-15.
  234. Caiado J, Lundberg M, Pedro E, Pereira-Santos MC, Barbosa MP. Snail allergy without house dust mites sensitisation. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2009 Mar-Apr;37(2):107-8.
  235. Bessot JC, Metz-Favre C, Rame JM, De Blay F, Pauli G. Tropomyosin or not tropomyosin, what is the relevant allergen in house dust mite and snail cross allergies? *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;42(1):3-10.

236. Wu AY, Williams GA. Clinical characteristics and pattern of skin test reactivities in shellfish allergy patients in Hong Kong. *Allergy Asthma Proc.* 2004 Jul-Aug; 25(4):237-42.
237. Gupta RS, Lau CH, Hamilton RG, Donnell A, Newhall KK. Predicting outcomes of oral food challenges by using the allergen-specific IgE-total IgE ratio. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014 May-Jun; 2(3):300-5.
238. Wang J, Calatroni A, Visness CM, Sampson HA. Correlation of specific IgE to shrimp with cockroach and dust mite exposure and sensitization in an inner-city population. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Oct; 128(4):834-7.
239. Yadzir ZH, Misnan R, Abdullah N, Bakhtiar F, Arip M, Murad S. Identification of IgE-binding proteins of raw and cooked extracts of *Loligo edulis* (white squid). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2010 May; 41(3):653-9.
240. Osterballe M, Bindslev-Jensen C. Threshold levels in food challenge and specific IgE in patients with egg allergy: is there a relationship? *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jul; 112(1):196-201.
241. Yavuz ST, Sahiner UM, Buyuktiryaki B, Tuncer A, Yilmaz EA, Cavkaytar O, Karabulut E, Sackesen C. Role of specific IgE in predicting the clinical course of lentil allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013 Jun; 24(4):382-8.
242. Yavuz ST, Buyuktiryaki B, Sahiner UM, Birben E, Tuncer A, Yakarisik S, Karabulut E, Kalayci O, Sackesen C. Factors that predict the clinical reactivity and tolerance in children with cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013 Apr; 110(4):284-9.
243. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Oct; 100(4):444-51.
244. Pesonen M, Kallio MJ, Siimes MA, Ranki A. Allergen skin prick testing in early childhood: reproducibility and prediction of allergic symptoms into early adulthood. *J Pediatr.* 2015 Feb; 166(2):401-406.e1.
245. Shimakura K, Tonomura Y, Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease

- digestión. Food Chem. 2005; 91(2):247-253) (Davis PJ, William SC. Protein modification by thermal processing. Allergy 1998; 53(46 suppl):102-105.
246. Lind P. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol. 1985; 76:753-61
247. Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. J Exp Med. 1988; 167:175-82.
248. Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, Turner KJ, Stewart GA, Thomas WR. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p 2 by IgE plaque immunoassay. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1990; 91:118-23.
249. Arlian LG, Morgan MS, Vyszynski-Moher DL, Sharra D. Cross-reactivity between storage and dust mites and between mites and shrimp. Exp Appl Acarol. 2009 Feb; 47(2):159-72.
250. Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Chatchatee P, Busse PJ, Sampson HA. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol Aug; 2002 110(2):293-7
251. Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. Allergy 2007; 62(7):758-65.
252. Frank R. The SPOT synthesis technique-Synthetic peptide arrays on membrane supports – principles and applications. J Immunol Methods 2002; 267(1):13-26
253. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. Science Sep 8; 2000 289(5485):1760-3.
254. Panicker RC, Huang X, Yao SQ. Recent advances in peptide-based microarray technologies. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening Sep; 2004 7(6):547-56

255. Lemon-Mule L-MH, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Wegrzyn A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122; 977-83.
256. Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:342-7.
257. Reese G, Viebranz J, Leong-Kee SM et al. Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *J Immunol* 2005; 12:8354-64
258. Albrecht M, Kühne Y, Ballmer-Weber BK et al. Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124; 328-36.
259. Pascal M, Grishina G, Yang AC, Sánchez-García S, Lin J, Towle D, Ibañez MD, Sastre J, Sampson HA, Ayuso R. Molecular Diagnosis of Shrimp Allergy: Efficiency of Several Allergens to Predict Clinical Reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015 Jul-Aug;3(4):521-529.

# **ANEXOS**





## **Anexo I. Bibliografía publicada relacionada con esta tesis**

### Como primera autora:

- Ayuso R, Sánchez-García S, Pascal M, Lin J, Grishina G, Fu Z, Ibáñez MD, Sastre J, Sampson HA. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? Clin Exp Allergy. 2012 Feb;42(2):293-304.
- Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. Allergy. 2011 Oct;66(10):1375-83

### Como co-autora:

- Pascal M, Grishina G, Yang AC, Sánchez-García S, Lin J, Towle D, Ibáñez MD, Sastre J, Sampson HA, Ayuso R. Molecular Diagnosis of Shrimp Allergy: Efficiency of Several Allergens to Predict Clinical Reactivity. J Allergy Clin Immunol Pract. 2015 Jul-Aug;3(4):521-529.
- Gámez C, Zafra MP, Boquete M, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, Sánchez-García S, Sastre J, Del Pozo V. New shrimp IgE-binding proteins involved in mite-seafood cross-reactivity. Mol Nutr Food Res. 2014 Sep;58(9):1915-25
- Ayuso R, Sánchez-García S, Lin J, Fu Z, Ibáñez MD, Carrillo T, Blanco C, Goldis M, Bardina L, Sastre J, Sampson HA. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. J Allergy Clin Immunol. 2010 Jun;125(6):1286-1293
- Ayuso R, Grishina G, Ibáñez MD, Blanco C, Carrillo T, Bencharitiwong R, Sánchez S, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. J Allergy Clin Immunol. 2009 Jul;124(1):114-20.

## PUBLICACIONES

### Artículos:

1. AUTORES: Escudero C, Rodríguez Del Río P, Sánchez-García S, Pérez-Rangel I, Pérez N, García-Fernández C, Ibáñez MD.  
TITULO: Early Sustained Unresponsiveness After Short-course Egg Oral Immunotherapy: a Randomized Controlled Study in Egg Allergic Children.  
REVISTA: Clin Exp Allergy. 2015 Aug 3. doi: 10.1111/cea.12604.
2. AUTORES: Pascal M, Grishina G, Yang AC, Sánchez-García S, Lin J, Towle D, Ibañez MD, Sastre J, Sampson HA, Ayuso R.  
TITULO: Molecular Diagnosis of Shrimp Allergy: Efficiency of Several Allergens to Predict Clinical Reactivity.  
REVISTA: J Allergy Clin Immunol Pract. 2015 Mar 11
3. AUTORES: Sánchez-García S, Rodríguez Del Río P, Escudero C, García-Fernández C, Ibáñez MD.  
TITULO: Exercise-induced bronchospasm diagnosis in children. Utility of combined lung function tests.  
REVISTA: Pediatr Allergy Immunol. 2015 Feb;26(1):73-9
4. AUTORES: Rodríguez del Río P, Díaz-Perales A, Sanchez-García S, Escudero C, Santos P, Catarino M, Ibañez MD.  
TÍTULO: Oral immunotherapy in children with IgE-mediated wheat allergy: outcome and molecular changes.  
REVISTA: J Investig Allergol Clin Immunol. 2014;24(4):240-8.
5. AUTORES: Gámez C, Zafra MP, Boquete M, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, Sánchez-García S, Sastre J, Del Pozo V.  
TÍTULO: New shrimp IgE-binding proteins involved in mite-seafood cross-reactivity.

REVISTA: Mol Nutr Food Res. 2014 Sep;58(9):1915-25

6. AUTORES: Cases B, Ibañez MD, Tudela JI, Sanchez-Garcia S, Del Rio PR, Fernandez EA, Escudero C, Fernandez-Caldas E.

TÍTULO: Immunological cross-reactivity between olive and grass pollen: implication of major and minor allergens.

REVISTA: World Allergy Organ J. 2014 May 8;7(1):11

7. AUTORES: Escudero C, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Pastor-Vargas C, García-Fernández C, Pérez-Rangel I, Ramírez-Jiménez A, Ibañez MD

TÍTULO: Dehydrated egg white: an allergen source for improving efficacy and safety in the diagnosis and treatment for egg allergy.

REVISTA: Pediatr Allergy Immunol. 2013 May;24(3):263-9.

8. AUTORES: Campo P, Rodríguez F, Sánchez-García S, Barranco P, Quirce S, Pérez-Francés C, Gómez-Torrijos E, Cárdenas R, Olaguibel JM, Delgado J; Severe Asthma Workgroup; SEAIC Asthma Committee.

TÍTULO: Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: new treatments.

REVISTA: J Investig Allergol Clin Immunol. 2013;23(2):76-88;

9. AUTORES: Barranco P, Pérez-Francés C, Quirce S, Gómez-Torrijos E, Cárdenas R, Sánchez-García S, Rodríguez-Fernández F, Campo P, Olaguibel JM, Delgado J; Severe Asthma Working Group of the SEAIC Asthma Committee

TÍTULO: Consensus document on the diagnosis of severe uncontrolled asthma.

REVISTA: J Investig Allergol Clin Immunol. 2012;22(7):460-75

10. AUTORES: Zafra MP, Cancelliere N, Rodríguez Del Río P, Ruiz-García M, Estévez L, Andregnette V, Sánchez-García S, Fiandor A, Collantes E, Sastre J, Quirce S, Ibañez MD, Del Pozo V

TÍTULO: Misregulation of suppressors of cytokine signaling in eosinophilic esophagitis.

REVISTA: J Gastroenterol. 2012 Dec 11.

11. AUTORES: Ortega Casanueva C, Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Escudero C, Andregnette V, Ibáñez MD

TÍTULO: Frey syndrome in children: a nonallergic cause of facial erythema triggered by food.

REVISTA: J Investig Allergol Clin Immunol. 2012;22(4):295-7.

12. AUTORES: Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Escudero C, García-Fernández C, Ramirez A, Ibáñez MD

TÍTULO: Efficacy of oral immunotherapy protocol for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy.

REVISTA: Isr Med Assoc J. 2012 Jan;14(1):43-7.

13. AUTORES: Rodríguez del Río P, Sánchez-García S, Escudero C, Pastor-Vargas C, Sánchez Hernández JJ, Pérez-Rangel I, Ibáñez MD

TÍTULO: Allergy to goat's and sheep's milk in a population of cow's milk-allergic children treated with oral immunotherapy.

REVISTA: Pediatr Allergy Immunol. 2012 Mar ;23(2):128-32.

14. AUTORES: Sánchez-García S, Rodríguez Del Río P, Escudero C, Martínez-Gómez MJ, Ibáñez MD

TÍTULO: Possible eosinophilic esophagitis induced by milk oral immunotherapy.

REVISTA: J Allergy Clin Immunol. 2012 Apr; 129(4):1155-7.

15. AUTORES: Ayuso R, Sánchez-García S, Pascal M, Lin J, Grishina G, Fu Z, Ibáñez MD, Sastre J, Sampson HA

TÍTULO: Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity?

REVISTA: Clin Exp Allergy. 2012 Feb; 42(2):293-304.

16. AUTORES: Sastre J, Manso L, Sanchez-García S, Fernández-Nieto M

TÍTULO: Medical and economic impact of misdiagnosis of drug hypersensitivity in hospitalized patients.

REVISTA: J Allergy Clin Immunol. 2012 Feb; 129(2):566-7

17. AUTORES: Rodríguez del Río P, Sanchez-Garcia S.

TÍTULO: European Academy of Allergy and Clinical Immunology task force report on “dose-response relationship in allergen-specific immunotherapy”. Comments on medical literature’s articles.

REVISTA: Hellenic Allergology and Clinical Immunology 2011 4(1-2): 56-63

18. AUTORES: Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V.

TÍTULO: Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy.

REVISTA: Allergy. 2011 Oct; 66(10):1375-83

19. AUTORES: Sánchez-García S, Ibáñez MD, Martínez-Gómez MJ, Escudero C, Vereda A, Fernández-Rodríguez M, Rodríguez del Río P.

TÍTULO: Eosinophilic esophagitis, celiac disease, and immunoglobulin E-mediated allergy in a 2-year-old child.

REVISTA: J Investig Allergol Clin Immunol. 2011;21(1):73-5.

20. AUTORES: Ayuso R, Sánchez-Garcia S, Lin J, Fu Z, Ibáñez MD, Carrillo T, Blanco C, Goldis M, Bardina L, Sastre J, Sampson HA.

TÍTULO: Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than adults suggests that shrimp sensitization decreases with age.

REVISTA: J Allergy Clin Immunol. 2010 Jun;125(6):1286-1293

21. AUTORES: Ayuso R, Grishina G, Ibáñez MD, Blanco C, Carrillo T, Bencharitiwong R, Sánchez S, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA.

TÍTULO: Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen.

REVISTA: J Allergy Clin Immunol. 2009 Jul; 124(1):114-20.

22. AUTORES: Sánchez-García S, Fernández-Nieto M, Sastre J.

TÍTULO: Asthma induced by a Thermal Printer.

REVISTA: N Engl J Med. 2009 May 28; 360(22):2375-6

23. AUTORES: M. Perez-Gordo, S. Sánchez-García, B. Cases, C. Pastor, F.Vivanco, J. Cuesta-Herranz.

TÍTULO: Identification of vitellogenin as an allergen in Beluga caviar allergy.

REVISTA: Allergy. 2008 Apr; 63(4):479-80

### **Capítulos de libros:**

1. AUTORES: Silvia Sánchez García

TÍTULO: Peculiaridades del asma grave en el niño. Fenotipos.

LIBRO: Asma grave. Pilar Barranco Sanz y Santiago Quirce Gancedo. Ed Luzán 5, 2013 (p.219-237)

2. AUTORES: Remedios Cárdenas y M.Jose Giménez, Mercedes Rodríguez, Arantza Martin y Elisa Gómez, Valentina Gutiérrez, Jose Olaguibel, Joaquin Sastre y Carmen Segura, Fernando Rodriguez y F.Javier Iglesias, Paloma Campo, Pilar Barranco, Alfons Torrego y David Ramos-Barbón, M.Jose Alvarez, M.Jose Pascual y J.Maria Vega, Rosa Muñoz, Javier Dominguez, Silvia Sánchez.

TÍTULO: Particularidades de las pruebas de función pulmonar e inflamación bronquial en el niño.

LIBRO: Pruebas de función pulmonar e inflamación bronquial en el asma. Julio Delgado y Santiago Quirce. Ed. GlaxoSmithKline, 2012 (p. 261-278)

3. AUTORES: P. Rodríguez del Río, S. Sánchez-García, C. Escudero Díez, M.D. Ibáñez Sandín.

TÍTULO: Urticaria y angioedema.

LIBRO: Pediatría Integral. Vol. XIII. Número 9. Ediciones Ergon, S.A. Noviembre 2009. (p. 787-807).

4. AUTORES: Silvia Sánchez-García, Luis Manso Alonso.  
TÍTULO: Asma ocupacional.  
Libro: Guía Rápida para Residentes de Alergología. Tomás Chivato y Carlos Colás. Ed. Luzán, 2009 (p. 112-119).
5. AUTORES: MD Ibáñez Sandín, Silvia Sánchez-García  
TÍTULO: Inducción de tolerancia oral específica (SOTI). Protocolo de Alergia a leche.  
LIBRO: Novedades en Alergia. Ed. Alergosur, 2008 (p. 65-74)
6. AUTORES: Silvia Sánchez-García  
TÍTULO: Alergia en edad escolar  
LIBRO: Procesos médicos que afectan al niño en edad escolar. Repercusiones en el entorno educativo. Maria Rosa Salas Labayen. Ed. Elsevier Masson, 2008. (p. 233-243)
7. AUTORES: Silvia Sánchez-García, Luis Manso Alonso  
TÍTULO: Repercusiones escolares de alergia y asma.  
LIBRO: Procesos médicos que afectan al niño en edad escolar. Repercusiones en el entorno educativo. Maria Rosa Salas Labayen. Ed. Elsevier Masson, 2008. (p. 253-264).
8. AUTORES: Silvia Sánchez-García  
TÍTULO: Asma por biguanidinas  
LIBRO: Sesiones Interhospitalarias Sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica. Nº18. Curso 2008-2009. Ed. Aulamédica (p.217-230).
9. AUTORES: Silvia Sánchez-García

TÍTULO: Asma ocupacional por un alergeno minoritario al polen de olivo.

LIBRO: Sesiones Interhospitalarias Sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica. Nº17. Curso 2007-2008. Ed. Luzán 5 (p.171-174).

10. AUTORES: Silvia Sánchez-García

TÍTULO: Asma ocupacional por un máquina terminal punto de venta.

LIBRO: Sesiones Interhospitalarias Sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica. Nº17. Curso 2007-2008. Ed. Luzán 5 (p.175-181).

11. AUTORES: Silvia Sánchez-García

TÍTULO: Alergia alimentaria en Nochevieja.

LIBRO: Sesiones Interhospitalarias Sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica. Nº16. Curso 2006-2007. Ed. Luzán 5 (p.107-110).

12. AUTORES: S. Sánchez-García, J. Sastre Domínguez, B. Sastre Turrión, V. del Pozo Abejón, M. Fernández-Nieto.

TÍTULO: Mujer de 62 años, vendedora de cupones, con rinitis y asma.

LIBRO: Casos clínicos de Residentes en Alergología 2008. Ed. Luzán, 2008 (p. 105-108).

13. AUTORES: S. Sánchez-García, M. Pérez Gordo, B. Cases Ortega, C. Pastor Vargas, J. Cuesta Herranz.

TÍTULO: Alergia alimentaria en Nochevieja

LIBRO: Casos clínicos de Residentes en Alergología 2007. Ed. Luzán, 2007 (p.253-256)

14. AUTORES: S. Sánchez-García, A. Enríquez-Matas, M. de las Heras Gozalo

TÍTULO: Mujer de 79 años con angioedema y eosinofilia



LIBRO: Casos clínicos de Residentes en Alergología 2007. Ed. Luzán, 2007 (p. 295-297)

15. AUTORES: S. Sánchez-García, M.R. Haro Ramos, A. Vereda Ortiz, A. Cazorla Jiménez, S. Quirce Gancedo.

TÍTULO: Mujer de 70 años con lesiones maculopapulosas generalizadas e irritación ocular tras comenzar tratamiento con sales de oro.

LIBRO: Casos clínicos de Residentes en Alergología 2006. Ed. Luzán, 2006. (p.37-39)

---

#### **PONENCIAS TIPO PÓSTER / COMUNICACIONES ORALES:**

Como primera autora, más de 18 comunicaciones orales y 14 comunicaciones tipo póster en congresos internacionales y más de 10 comunicaciones en congresos nacionales.

#### **PONENCIAS EN MESAS REDONDAS Y SIMPOSIA:**

Ponente en 11 simposia y mesas redondas de congresos nacionales e internacionales

---

#### **OTROS**

Programa *in company* "Talento en Alergia", completando 53 horas lectivas de las siguientes materias: Gestión, Política Sanitaria, Health Economics, Autoconocimiento, Liderazgo, Habilidades de comunicación, Motivación y gestión de equipos sanitarios de alto rendimiento. Instituto de Empresa – Business School. Madrid, curso 2013-2014.

Revisora de la revista "Journal Investigational Allergy and Clinical Immunology" desde Junio 2013.

Miembro del Jurado en la evaluación de las comunicaciones al IX Congreso Colombiano de Alergia, Asma e Inmunología. Mayo 2013.

Miembro del Jurado en la evaluación de las comunicaciones al Congreso Europeo y Mundial de Alergia e Inmunología Clínica, Milán. Junio 2013.

---

#### **ESTANCIAS EN CENTROS EXTRANJEROS (superiores a 4 semanas)**

CENTRO: Mount Sinai School of Medicine, Jaffe Food Allergy Institute

LOCALIDAD: New York

PAIS: Estados Unidos

AÑO: 2008

DURACIÓN: 4 meses

TEMA: Caracterización y mapeo epitópico de los alérgenos de gamba.

---

#### **PREMIOS Y DISTINCIONES**

1. Premio Presidencial al Reconocimiento y Colaboración. Organización Mundial de Alergia, Diciembre de 2011
2. Mejor abstract en la sección "Avances en el diagnóstico y manejo de la alergia alimentaria". Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, Junio de 2011

3. Mejor abstract en la sección "Diagnóstico de alergia alimentaria y novedades destacables recientes", Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, Junio de 2011
4. Premio al mejor póster general de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica en la categoría de casos clínicos: enfermedades mediadas por respuesta inmune. Barcelona, EAACI 2008
5. Primer premio al mejor caso clínico presentado por un Miembro Joven de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica. Barcelona, EAACI 2008.
6. Premio en la sección "Alergia Respiratoria" al mejor caso clínico de residentes en Alergología. "Mujer de 62 años, vendedora de cupones, con rinitis y asma". Sociedad Española de Alergia e Inmunología, 2008. Ed. Luzán.
7. Galardonada con una beca WAO (Organización Mundial de Alergia) para estancias cortas en el extranjero, por el trabajo "Estudio del papel de la tropomiosina en alergia a gamba. Comparación de población estadounidense y española", para estudiar con Dr. Sampson en Mount Sinai, Nueva York, desde Septiembre hasta Diciembre de 2008.
8. Premio al mejor póster de miembros Jóvenes. Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica. Göteborg 2007, Suecia.
9. Premio al mejor poster general en la categoría de Alergia a Alimentos. Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica. Göteborg (Suecia) 2007.
10. Premio en la sección "Miscelánea" al mejor caso clínico de residentes en Alergología. "Mujer de 70 años con angioedema y eosinofilia". Sociedad Española de Alergia e Inmunología, 2007. Ed. Luzán

11. Premio en la sección “Alergia a Alimentos” al mejor caso clínico de residentes en Alergología. “Mujer de 50 años con alergia en Nochevieja”. Sociedad Española de Alergia e Inmunología, 2007. Ed Luzán
- 

#### **ACTIVIDAD EN SOCIEDADES CIENTÍFICAS:**

- a. En la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, miembro del Comité de Comunicación, de Alergia Infantil y de Asma, así como Secretaria del Comité de Jóvenes Alergólogos y MIR.
  - b. En la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, responsable de redes sociales y enlace con la revista *Pediatric Allergy and Immunology* del Comité de Miembros Jóvenes. Representante joven y webmaster del Comité de Asma.
  - c. En la Organización Mundial de Alergia, co-fundadora y presidenta del Comité de Miembros Jóvenes, ejerciendo este cargo desde 2011 hasta 2013. En la actualidad, consultora de dicho comité y Miembro Permanente del Comité de Asma Pediátrico.
- 

#### **IDIOMAS**

- Castellano: Competencia nativa o bilingüe
  - Gallego: Competencia nativa o bilingüe
  - Inglés: Competencia profesional completa
  - Francés: Competencia básica limitada
  - Alemán: Competencia básica limitada
-



# **AGRADECIMIENTOS**



Decía Ever Garrison que *“un maestro es una brújula que activa los imanes de la curiosidad, el conocimiento y la sabiduría en los alumnos”*. Gracias al Dr. Sastre y a la Dra. Ibáñez, por ser mi brújula. Por mostrarme el pensamiento científico, por enseñarme esa búsqueda incansable del aprendizaje bien hecho, por inyectarme el virus de la curiosidad investigadora. A Paloma y a Joaquín, por confiar en mí y ayudarme, desde mi primer instante dedicado a la Alergología hasta... hace un rato.

A la Dra. Rosalía Ayuso, por su apoyo, orientación en el diseño del estudio y haberme enseñado las bases de la investigación. A la Dra. Victoria del Pozo y el Servicio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz por guiar, con paciencia, mis primeros pasos en un laboratorio de investigación. A Ignacio Mahillo, por ayudarme a comprender y aplicar el complicado mundo de los números al arte de la medicina.

Al Dr. Hugh Sampson, por abrirme las puertas de su centro y permitirme acceder a la tecnología más puntera. A la World Allergy Organization, por apoyarme económicamente a que mi estancia en Estados Unidos fuese más fácil al concederme una beca de corta estancia. Al equipo del Jaffe Institute for Food Allergy, del Mount Sinai School of Medicine (New York), por ayudarme a crecer profesional y personalmente.

A los *“conchitos”*, por haberme revelado que la Medicina no es, y no debe ser, una ciencia, sino un Arte. Y que un buen médico pasa primero por ser un buen artista.

A Carmelo, auténtico mago de la Alergia, por recordarme constantemente las enseñanzas más importantes que recibí durante mi período de residencia: ese *“espíritu conchito”*, y a no olvidar nunca el lado humano de nuestra profesión.

A Pablo, gran compañero, por hacer que sea tan sencillo trabajar en equipo.

A Adelaida, a Ascen, a Cati y a Inma, por su cariño, y por demostrar incansablemente el gran potencial de la enfermería de Alergia.



A los pacientes, que han donado generosamente su tiempo y su sangre para que este trabajo fuese posible.

A Javier.

A todos los que me hacéis sentir que estáis a mi lado, día tras día, haciendo que cada paso que doy hacia delante sea más enriquecedor, y que las ganas de lo que queda por vivir, por luchar, por descubrir, por investigar, sean incluso más motivadoras que la fascinación del momento presente.





*In the clearing stands a boxer  
And a fighter by his trade  
And he carries the reminders  
Of every glove that layed him down  
Or cut him till he cried out  
In his anger and his shame  
"I am leaving, I am leaving"  
But the fighter still remains*

*(Paul Simon)*



